

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2020

Bc. Natália Čurillová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ŠTÚDIUM TRANSGLYKOZYLÁZ KVASINIEK

STUDY OF YEASTS TRANSGLYCOSYLASES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natália Čurillová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1425/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Natália Čurillová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Stratilová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Štúdium transglykozyáz kvasiniek

Zadání diplomové práce:

V rámci diplomovej práce sa budú indukovať transglykozyázy bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (Crh 2) a *Candida albicans* (Phr1 a Phr2) do kultivačného média exprimovaných kmeňov *Pichia pastoris*. Tieto enzýmy sa prečistia na základe vloženého His-tagu a ich čistota sa overí SDS-PAGE. Pripraví sa fluorescenčne značený oligosacharid ako akceptorový substrát na stanovenie aktivity týchto enzýmov. Následne sa bude testovať účinok 67 komerčných inhibítorov na Phr1 a Phr2 tzv. fluorescenčnou "dot-blot" metódou a výsledok sa overí pomocou HPLC s fluorescenčným detektorom. Ďalším krokom bude stanovenie spôsobu účinku enzýmov na vysokomolekulárny donor (tiež HPLC) a jeho porovnanie s účinkom iných transglykozyáz. V prípade Crh2 sa stanoví afinita enzýmu k akceptorom s rôznym stupňom polymerizácie.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natália Čurillová
student(ka)

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Práca sa venuje štúdiu vlastností fungálnych transglykozyláz, konkrétne Phr1, Phr2 a Crh2, podieľajúcich sa na prestavbe bunkových stien kvasiniek v dôsledku štiepenia štruktúrálnej polysacharidovej molekuly a prenosu jej časti na druhú (poly)sacharidovú-akceptorovú molekulu. Cicavčie bunky neobsahujú bunkové steny, teda ani transglykozylázy, preto sú tieto enzýmy vhodným cieľom pre pôsobenie antifungálnych látok. V rámci tejto diplomovej práce bol skúmaný účinok 67 komerčne dostupných inhibítorov na enzýmy Phr1 a Phr2 pomocou rýchleho skríningu. V prípade enzýmu Phr1 vykazovali dva inhibítory potenciálny účinok, ktorý bol overený na kolóne s molekulovým sitom pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Zistilo sa, že ani jedna z testovaných látok nemala inhibičný vplyv na Phr1 alebo Phr2, na rozdiel od DMSO, v ktorom boli inhibítory rozpustené. Spôsob účinku Phr enzýmov bol študovaný pomocou tenkovrstvovej a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Prvý spôsob umožnil monitorovať tvorbu produktov iba v neskorších štádiách reakcie, ale metóda HPLC s delením reakčnej zmesi molekulovým sitom umožnila sledovať vznik produktov aj v počiatoch reakcie. Enzým Phr1 štiepi donorový substrát blízko neredukujúceho konca, čím vznikajú malé fragmenty, ktoré sú prenášané na značené akceptory počas celej reakcie. Enzým Phr2 pôsobí náhodne, čím od počiatku reakcie vznikajú aj produkty s vyššou molekulovou hmotnosťou. Práca sa venovala aj štúdiu stupňa polymerizácie akceptora na jeho afinitu s enzýmom Crh2. Michaelis-Mentenovej konštanty nevykazovali žiaden vplyv stupňa polymerizácie na afinitu akceptora s enzýmom Crh2.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Transglykozylázy, Crh, Phr, kvasinky, bunková stena, antifungálne látky

ABSTRACT

This study is interested in properties of fungal transglycosylases, specifically Phr1, Phr2 and Crh2. These enzymes are involved in the remodelling of yeast cell walls due to their cleavage of structural donor polysaccharides and transfer of their fragments to the other acceptor (poly)saccharide molecules. The mammalian cells do not contain cell walls, nor cell wall transglycosylases, that's why these enzymes are possible targets for antifungal agents. In this diploma thesis the effect of 67 commercially available inhibitors on Phr1 and Phr2 enzymes was studied by rapid screening. In the case of the Phr1 enzyme, two inhibitors showed a potential effect which was subsequently tested by size exclusion chromatography column incorporated into HPLC device. None of the inhibitors were found to have an inhibitory effect on Phr1 or Phr2 enzymes in contrast to DMSO in which all inhibitors were dissolved. The mode of action of Phr enzymes was also studied by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. The first method allowed to monitor the formation of products only in the later stages of the reaction, but more sensitive size exclusion chromatography showed the product formation at the beginning of the reaction. Phr1 cleaved the donor substrate near the non-reducing end and forms small fragments that are transferred to labeled acceptors during the whole reaction. Phr2 utilized random action pattern, thus creating products with higher molecular weight from the beginning of reaction. The effect of the polymerization degree of acceptor on its affinity with the Crh2 was also studied. The Michaelis-Menten constants showed no effect of acceptor length on the affinity between enzyme and substrate.

KEYWORDS

Transglycosylases, Crh, Phr, yeast, cell wall, antifungal agents

ČURILLOVÁ, Natália. *Štúdium transglykozyláz kvasiniek*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124245>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Stratilová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej diplomovej práce Ing. Eve Stratilovej, PhD. za odborné vedenie, poskytnutie cenných rád a čas, ktorý mi venovala pri spracovávaní tejto práce. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Ágnes Horváthovej a Mgr. Barbore Stratilovej za pomoc počas riešenia experimentálnej časti. Na záver by som chcela poďakovať celej mojej rodine za podporu a dôveru počas celého štúdia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1 Kvasinky.....	10
2.1.1 Všeobecná charakteristika kvasiniek.....	10
2.2 Vybrané druhy kvasiniek.....	12
2.2.1 <i>Candida albicans</i>	12
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.2.3 <i>Pichia pastoris</i>	13
2.3 Bunková stena kvasiniek	14
2.3.1 Chitín	15
2.3.2 β -(1,3)-glukán	16
2.3.3 β -(1,6)-glukán	17
2.3.4 Manoproteíny.....	17
2.4 Klasifikácia enzýmov katalyzujúcich prenos glykozylovej skupiny.....	18
2.4.1 Rodina GH 16.....	19
2.4.2 Rodina GH 17	19
2.4.3 Rodina GH 18.....	20
2.4.4 Rodina GH 72	21
2.4.5 Rodina GH 76.....	23
2.5 Mechanizmus reakcií GH enzýmov	24
2.5.1 Mechanizmus GH s inverziou konfigurácie na anomérnom uhlíku	25
2.5.2 Mechanizmus GH so zachovanou konfiguráciou na anomérnom uhlíku.....	25
2.5.3 Transglykozylácia.....	26
2.6 Spôsoby stanovenia transglykozylačných aktivít.....	26
2.7 Fungálne infekcie	29
2.8 Antifungálne látky	31
2.8.1 Inhibítory TargetMol	32
3 CIEĽ PRÁCE	39

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	40
4.1 Zoznam použitých chemikálií	40
4.2 Zoznam použitých prístrojov	40
4.3 Fluorescenčné značenie oligosacharidov	42
4.3.1 Aminácia pentalaminarioligosacharidu	42
4.3.2 Zavedenie fluorescenčnej značky do glykamínu LaO5	43
4.3.3 Prečistenie fluorescenčne značeného produktu	44
4.3.4 Stanovenie LaO5 a LaO5-SR pomocou hmotnostnej spektrometrie	44
4.4 Indukcia enzýmov	44
4.4.1 Kmene <i>Pichia pastoris</i> pre expresiu rekombinantných kvasinkových transglykozyláz	44
4.4.2 Expresia, izolácia a purifikácia enzýmov Phr1 a Phr2	44
4.4.3 Expresia, izolácia a purifikácia Crh1 a Crh2	45
4.4.4 Stanovenie obsahu proteínov vo vzorkách	45
4.4.5 Overenie čistoty exprimovaných proteínov pomocou SDS-PAGE	46
4.4.6 Identifikácia proteínov v géloch pomocou hmotnostnej spektrometrie	46
4.5 Stanovenie transglykozylačných aktivít	47
4.5.1 Stanovenie aktivity pomocou fluorescenčnej „dot-blot“ metódy	47
4.5.2 Stanovenie aktivity Phr enzýmov pomocou kvapalinovej chromatografie na molekulovom site	48
4.6 Charakterizácia a inhibícia kvasinkových transglykozyláz	48
4.6.1 Vplyv inhibítorov na aktivitu Phr sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou ...	48
4.6.2 Overenie inhibície Phr1 pomocou kvapalinovej chromatografie na molekulovom site	49
4.6.3 Spôsob účinku Phr enzýmov	49
4.6.4 Vplyv stupňa polymerizácie akceptora na afinitu enzýmu Crh2	49
5 VÝSLEDKY	51
5.1 Fluorescenčné značenie oligosacharidov	51
5.1.1 Aminácia pentalaminarioligosacharidu	51
5.1.2 Zavedenie fluorescenčnej značky do glykamínu LaO5	52
5.1.3 Prečistenie fluorescenčne značeného produktu	52
5.2 Identifikácia exprimovaných proteínov a stanovenie ich aktivity a koncentrácie	54
5.2.1 Stanovenie aktivity exprimovaných enzýmov pomocou kvalitatívnej fluorescenčnej „dot-blot“ metódy	54

5.2.2 Stanovenie obsahu exprimovaných proteínov v prečistených vzorkách	55
5.2.3 Overenie čistoty exprimovaných proteínov pomocou SDS-PAGE.....	56
5.2.4 Identifikácia proteínov pomocou tryptického štiepenia	56
5.3 Charakterizácia a inhibícia kvasinkových transglykozyláz.....	60
5.3.1 Vplyv inhibítorov na Phr1 sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou	60
5.3.2 Vplyv inhibítorov na aktivitu Phr2 sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou .	62
5.3.3. Overenie vplyvu inhibítorov berberín hydrochlorid a mikonazol nitrát na aktivitu enzýmu Phr1 metódou delenia značených produktov a substrátov na molekulovom site .	63
5.3.4 Spôsob účinku Phr enzýmov sledovaný pomocou TLC a kvapalinovej chromatografie na molekulovom site.....	65
5.3.5 Vplyv stupňa polymerizácie akceptora na jeho afinitu enzýmom Crh2.....	67
6 ZÁVER.....	69
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	70
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	92
9 PRÍLOHY	94

1 ÚVOD

Kvasinky predstavujú skupinu ubikvitných eukaryotických mikroorganizmov, ktoré sú súčasťou pôd, vôd, fauny, flóry, ale aj ľudského tela. Asi najznámejší druh kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, našla využitie pri kvasných procesoch, výrobe vína, piva, prípadne droždí. Okrem kvasného priemyslu môžu byť niektoré kvasinky použité ako modelové organizmy s cieľom charakterizácie úloh génov v organizme. Z hľadiska medicíny sú nežiadúce z dôvodu vyvolávania rôznych infekcií. Náchylní na kvasinkové infekcie sú najmä pacienti s oslabeným imunitným systémom, napr. dlhodobo liečení antibiotikami, užívatelia antikoncepcie, pacienti po transplantácii orgánov, pacienti pozitívni na vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti HIV.

Vrchnú vrstvu kvasinkových buniek tvorí bunková stena, ktorá zabezpečuje ochranu bunky pred nepriaznivými vplyvmi, udržiava jej tvar, napomáha pri sexuálnom rozpoznaní buniek opačného typu a funguje ako sprostredkovateľ interakcií medzi bunkou a napadnutým hostiteľom. Hlavnými zložkami kvasinkovej bunkovej steny sú β -1,3-glukán, β -1,6-glukán, chitín a manoproteíny. Enzýmy, ktorých cieľom je prestavba bunkovej steny, sa nazývajú transglykozylázy. Ide o zvláštne enzýmy z rodín glykozylových hydroláz. Hlavnou úlohou transglykozyláz je štiepenie donorových molekúl (glukánov, chitínov, manoproteínov) a následne vytvorenie väzby medzi fragmentom rozštiepeného sacharidu a druhou molekulou sacharidu. V prípade štrukturálne rovnakých molekúl donora a akceptora sa jedná o homotransglykozyláciu. Ako vzor typických homotransglykozyláz môžu slúžiť Phr enzýmy kvasinky *Candida albicans*, ktoré ako donorový aj akceptorový substrát využívajú β -(1,3)-glukán. Naopak, ak sa donor a akceptor líšia, jedná sa o heterotransglykozyláciu. Ako vzor typických heterotransglykozyláz môžu slúžiť Crh enzýmy, ktoré sú zodpovedné za tvorbu väzieb medzi chitínom a β -(1,6)-glukánom.

Z dôvodu neprítomnosti chitínu a β -1,3-glukánu a v dôsledku toho aj príslušných transglykozyláz v bunkách cicavcov sú tieto enzýmy ideálnym terčom pre vývoj nových antimykotík. V súčasnej dobe sú mykotické infekcie čoraz častejšie. Najzávažnejším typom mykóz sú systémové mykózy, ktoré sú častou príčinou morbidít a mortality u imunokompromitovaných pacientov práve z dôvodu liečby obmedzeným počtom dostupných liekov. Problémom je aj rezistencia kvasiniek voči existujúcim liečivám. Práve z tohto dôvodu je dôležitý vývoj a výskum nových antimykotík, najmä takých, ktoré majú čo najmenší počet nepriaznivých účinkov na organizmus.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kvasinky

Kvasinky patria medzi rozmanité jednobunkové hubové mikroorganizmy, ktoré sa líšia tvarom, rozmerom a taktiež farbou. Jednými z hlavných faktorov ovplyvňujúcich metabolizmus kvasiniek je dostupnosť kyslíka a druh zdroja uhlíka. Veľké množstvo kmeňov dokáže fungovať pri aeróbných ale aj anaeróbných podmienkach. Ľudia už po stáročia využívajú schopnosť kvasiniek kvasiť sacharidy pri výrobe droždia, piva, vína. Kvasinky však nie je správne spájať iba s fermentačnou aktivitou. S vývojom vedy a techniky nadobudlo využitie kvasiniek aj iný rozmer, kvasinky sú užitočným nástrojom pri výrobe enzýmov, aminokyselín alebo vitamínov. V roku 1996 bol objasnený genóm kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, čo otvorilo príležitosť na globálne štúdium exprese a fungovania eukaryotického genómu [1].

2.1.1 Všeobecná charakteristika kvasiniek

Bunky kvasiniek môžu mať rôzne tvary, farbu a veľkosť, ktorá sa pohybuje v intervale 3-16 μm . Bežným pozorovaným tvarom kvasiniek je elipsa, no môžu sa objavovať v tvare oválu, gule, vretenovitom alebo citrónovitom. Väčšina kvasiniek má bielu alebo smotanovú farbu, zatiaľ čo kolónie niektorých kvasiniek produkujúcich pigmenty môžu mať ružové, oranžové až červené sfarbenie.

Kvasinková bunka sa skladá z niekoľkých komponentov. Časť, ktorá je zodpovedná za udržiavanie tvaru a ochranu bunky sa nazýva bunková stena, ktorej je venovaná kapitola 2.3.

Cytoplazmatická membrána je podobne ako iné biologické membrány opísaná ako lipidová dvojvrstva obklopujúca proteíny. Lipidové zložky obsahujú najmä fosfolipidy a steroly – najmä ergosterol a zymosterol. Hlavnou funkciou cytoplazmatickej membrány je transdukcia signálu, transmembránový transport rozpustných živín do bunky a produktov metabolizmu von z bunky. Rovnako ako bunková stena sa cytoplazmatická membrána mení štruktúrne aj funkčne v závislosti od podmienok rastu [2].

Cytoplazma predstavuje mierne kyslú (pH 5,2), koloidnú tekutinu, ktorá obsahuje zlúčeniny s nízkou a strednou molekulovou hmotnosťou, napríklad proteíny, glykogén. Sú v nej usporiadané organely potrebné pre správne fungovanie bunky, mitochondrie, vakuoly, lyzozómy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, a enzýmy, napr. glykolytické enzýmy alebo enzýmy potrebné k proteínovej biosyntéze.

Ďalšia dôležitá časť bunky je cytoskelet. Zložky cytoskeletu sa podľa funkcie a hrúbky delia na mikrofilamenty a mikrotubuly. Mikrofilamenty a mikrotubuly môžeme považovať za dynamické štruktúry, ktoré napomáhajú pohybu organel prostredníctvom spájania a rozpájania proteínových podjednotiek, majú významnú úlohu pri mitóze a meióze [3]. Mikrotubuly sú duté, valcovité polyméry zložené z tubulínu, ktorý sa skladá z α -tubulínu a β -tubulínu [4].

Prítomnosť jadra je jednou z definujúcich charakteristík eukaryotických buniek. Jadro je ohraničené dvojitou membránou, ktorá oddeľuje genetický materiál od prostredia zvyšku bunky, ktoré je fyzikálne a biochemicky odlišné [5]. V miestach prechodu vnútornej a vonkajšej membrány jadra sa nachádzajú nukleopóry. Hlavnou úlohou jadra je niest' a exprimovať genetickú informáciu bunky a súčasne zaistiť správnu expresiu, opravu a segregáciu chromozómov [6]. Bunka aktívne udržiava jadrový objem k bunkovému objemu, tzv. karyoplazmatický pomer [7].

Organely zodpovedné za dýchanie sa nazývajú mitochondrie. Mitochondrie majú dve membrány, vonkajšiu a vnútornú. Na vnútornej membráne je možné pozorovať krysty, ktoré sú vytvorené zvlnením vnútornej membrány do vnútornej časti mitochondrií, čo má za následok niekoľkonásobné zväčšenie plochy membrány. Pod vnútornou membránou sa nachádza mitochondriálny matrix, v ktorom je uložený proteosyntetický aparát a rôzne enzýmy. Ak sú bunky kultivované v prítomnosti nefermentovateľného substrátu ako je napr. glycerol alebo etanol, získanie energie závisí od oxidačnej fosforylácie a mitochondrie sú ľahko rozpoznateľné. V prítomnosti glukózy dochádza k výraznému potlačeniu biogenézy vnútornej membrány mitochondrií ale nedochádza k dramatickej zmene ich počtu [8].

Endoplazmatické retikulum je definované ako zhluk vnútrobunkových membrán, ktorý je tvorený mechúrikmi, cisternami a kanálikmi. Rozoznávame dva typy endoplazmatického retikula, hladké a drsné. Oba typy majú iné funkcie, hladké endoplazmatické retikulum sa zbavuje odpadných látok, zatiaľ čo drsné retikulum je zodpovedné za syntézu bielkovín a zároveň za degradáciu zle zložených proteínov, ktoré nedosiahli natívny stav. Na drsnom endoplazmatickom retikule sú naviazané ribozómy.

Vakuoly sú vyplnené bunkovou šťavou, v ktorej sa nachádzajú sacharidy, organické kyseliny, bielkoviny, tuky atď. Na povrchu vakuol sa nachádza priepustná membrána nazývaná tonoplast. V priebehu rastu bunky dochádza aj k zmene tvaru a veľkosti vakuoly. V mladších bunkách môže existovať niekoľko menších vakuol, v starších bunkách sa obvykle nachádza jedna väčšia vakuola, ktorá môže zaplňať veľkú časť priestoru bunky.

Ďalšou podstatnou organelou je Golgiho aparát, ktorého hlavnou funkciou je správa molekúl, ktoré boli produkované v endoplazmatickom retikule.

Lyzozómy, organely vychlípené z Golgiho aparátu sú zodpovedné za intracelulárny tráviaci systém bunky, keďže vďaka ich zásobe hydrolytických enzýmov môžu štiepiť proteíny, sacharidy atď. Podobnými organelami sú peroxizómy, ktoré však namiesto hydroláz obsahujú najmä degradujúce oxidázy.

Rozmnožovanie kvasiniek prebieha nepohlavne - pučaním alebo pohlavne. Pri nepohlavnom rozmnožovaní je na materskú bunku pripojený malý púčik, resp. dcérska bunka. Po vytvorení bunkovej steny je rozmnožovanie skončené a dochádza k oddeleniu materskej a dcérskej bunky. Pri multilaterálnom pučaní vzniká na materskej bunke jazva, na ktorej už žiadna dcérska bunka nevznikne, naopak pri bipolárnom pučaní môže dcérska bunka vzniknúť v mieste jazvy a vytvára sa viacnásobná jazva. Niektoré kvasinky môžu vytvárať zaškrvcované reťazce buniek tvoriace pseudomycélium, iné kvasinky vytvárajú pravé mycélium, ktoré vzniká pomocou

priečného delenia pretiahnutých buniek. Rozdiel medzi pseudomycéliom a pravým mycéliom je, že články reťazcov u pseudomycélia tvoria bunky s jedným jadrom, zatiaľ čo pravé mycélium je septované. Pri priečnom delení ide o dve rovnako veľké bunky, o materskú a dcérsku, ktoré sa hneď po vytvorení septa oddelia. Veľké množstvo kvasiniek tvorí exokonídie, ktoré sú uchytené na sterigmách, ktoré ich po dozrení vystreľujú. Ďalším spôsobom rozmnožovania je pohlavné rozmnožovanie charakteristické spájaním dvoch haploidných buniek za vzniku diploidného jadra, ktoré sa ďalej delí za vzniku štyroch haploidných jadier-pohlavných spór. Rozlišujeme bazídiomycétne a askomycétne kvasinky. Pri bazídiomycétnych sú dôležité sporídie a bazídiospóry. Haploiné bunky sa rozmnožujú pučaním a po ich zmiešaní dochádza k cytogamii a k vzniku dikaryotického mycélia, na ktorom vznikajú spriažky, pomocou ktorých prechádza jadro do ďalšej bunky. Vzniká heterokaryotická bunka a teliospóra, ktorá kľíči vo forme promycélia a dochádza k meióze [9].

2.2 Vybrané druhy kvasiniek

2.2.1 *Candida albicans*

Rod *Candida* pozostáva z približne 200 mimoriadne rozmanitých druhov kvasiniek. Väčšina ľudí si rod *Candida* spája s chorobami, ale iba minoritné množstvo druhov predstavuje patogény. Jednými z nich sú *Candida albicans* a *Candida tropicalis*, ktoré predstavujú až 80 % klinických izolátov. Menej často sa vyskytuje *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* a *Candida pseudotropicalis*. Najviac študovaným druhom je práve *C. albicans*. Meyer et al. rozdelili rod *Candida* do 10 skupín podľa fyziologických vlastností, druh *C. albicans* zaradili do 7. skupiny. Hlavným znakom tejto skupiny je schopnosť utilizovať maltózu ale nie inozitol, erythritol a rafinózu ako zdroj uhlíka. Ďalším znakom je neschopnosť redukovať diazóniovú modrú [10]. V minulosti bolo taxonomické zaradovanie kvasiniek založené najmä na fyzických črtách, ktoré súviseli s pohlavným rozmnožovaním. Preto, keďže sa u mnohých druhov *Candida* nikdy nezistilo, že majú v životnom cykle sexuálne štádium, boli pôvodne označené ako „fungi imperfecti“. V posledných rokoch pomohli DNA sekvenčné metódy potvrdiť taxonomické vzťahy v rámci rodu, boli použité aj k potvrdeniu, že kvasinky *Candida* sú askomycétami [11].

C. albicans sa bežne vyskytuje na ľudských slizničných povrchoch, ako napríklad sliznica úst, čriev, vaginálna sliznica, koža. Niekoľko štúdií potvrdilo pomocou rôznych molekulárnych techník podobnosť medzi komenzálnymi a infekčnými izolátmi, čo podporuje myšlienku, že infekčné kmene pochádzajú z vlastnej flóry pacienta. *C. albicans* je teda výborne prispôsobená kolonizovať povrchy slizníc a medzi komenzalizmom a infekciou existuje jemná rovnováha. Aj keď je *C. albicans* veľmi často označovaná ako oportunistický patogén, infekcia nebýva striktne obmedzená na pacientov so zníženou imunitou, pretože *C. albicans* môže spôsobiť infekcie aj u zdravých jedincov v dôsledku porúch v normálnej – zdravej flóre kvôli užívaniu antibiotík alebo vaginálnej infekcie, ktorá je spôsobená hormonálnymi zmenami [12].

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

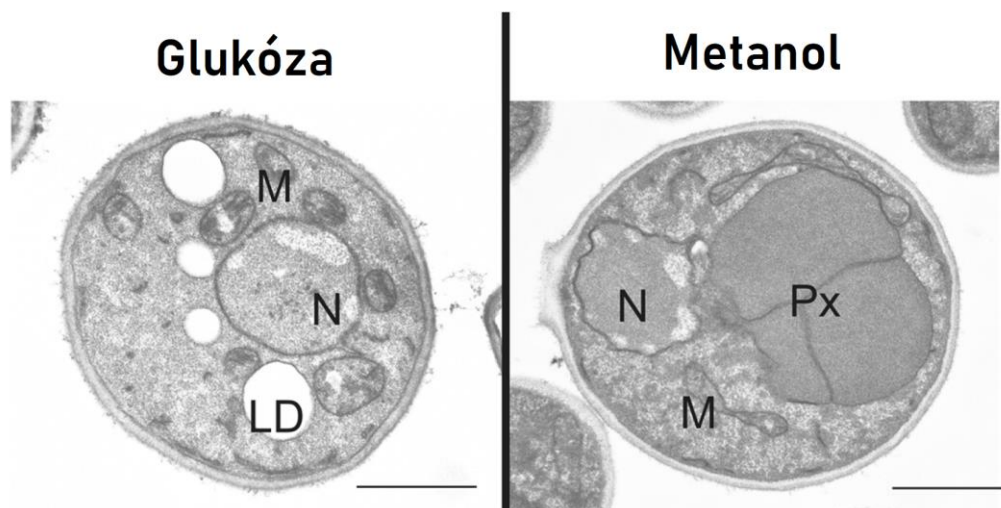
Jedným z najznámejších druhov kvasiniek je *Saccharomyces cerevisiae*. Táto kvasinka sa už od pradávna využíva v kvasných procesoch s cieľom výroby piva, vína a droždia. Biochémia a genetika *S. cerevisiae* je všeobecne známa, čo z nej robí jeden z najštudovanejších eukaryotických organizmov, čo má za následok aj jej využitie ako modelové organizmu v oblasti genetiky. Práve štúdium mikroorganizmov a ich genómov dopomohlo aj k lepšiemu pochopeniu ľudského genómu.

2.2.3 *Pichia pastoris*

Kvasinka *Pichia pastoris* sa radí medzi metanoltrofné mikroorganizmy, t.j. je schopná získať uhlík a energiu potrebnú na rast z metanolu. Túto schopnosť majú aj niektoré druhy kvasiniek *Candida*, *Ogataea*, *Komagataella*. Keď sa *P. pastoris* kultivuje na metanole ako jedinom zdroji uhlíka a energie, indukujú sa enzýmy, ktoré sa zapájajú do metabolizmu metanolu a ktoré sú obsiahnuté v peroxizómoch, t.j. alkohol oxidáza, dihydroxyacetón syntáza, kataláza. Oxidáciou metanolu vzniká formaldehyd a peroxid vodíka [13].

P. pastoris je veľmi často používaným druhom na produkciu rekombinantných proteínov. Práve konštrukcia *P. pastoris*, jej rast a manipulácia s týmto expresným systémom sú v mnohých prípadoch podobné bakteriálnym expresným systémom, napr. *Escherichia coli* [14]. *Pichia* na rozdiel od *S. cerevisiae* uprednostňuje respiračný pred fermentačným spôsobom rastu a teda nehromadí toxické hladiny etanolu, ktoré by ju mohli inhibovať. Druhým rozdielom je glykozylácia, ktorá je podobná ako u vyšších eukaryotických organizmov na rozdiel od glykozylácie *Saccharomyces*, ktorá má tendenciu hyperglykozylovať N-glykozidy [15].

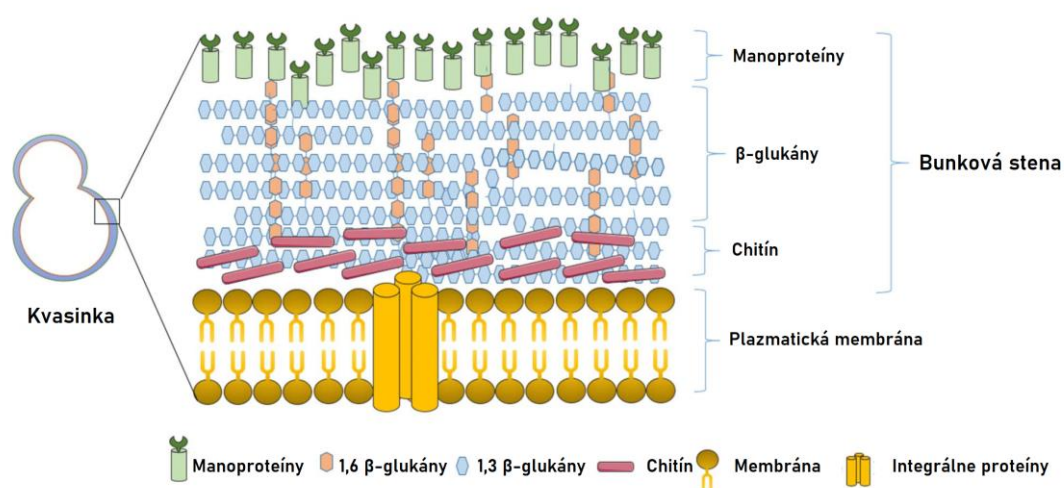
Rekombinantú expresiu proteínov z *P. pastoris* môžeme doceliť v banke na trepačke, no úrovne expresie vo fermentoroch sú zvyčajne vyššie. Pre veľkú časť aplikácií sa využíva fermentačná schéma s tromi fázami. V prvej fáze sa kvasinky kultivujú vsádzkovým spôsobom v médiu, kde je hlavným zdrojom uhlíka glycerol. Cieľom fázy je akumulácia biomasy. Druhou fázou je prídavok ďalšieho glycerolu. Poslednou, indukčnou fázou, je pridávanie metanolu s cieľom vyvolať expresiu rekombinantného proteínu. Interval a množstvo pridávania metanolu sa upravuje až kým sa nedosiahne požadovaná rýchlosť a hladina expresie [15].



Obrázok 1: Snímka z elektrónového mikroskopu. Bunky *P. pastoris* kultivované na glukóze a metanole ako jedinom zdroji uhlíka. N- jadro, M- mitochondrie, Px- peroxizómy, LD- lipid [16]

2.3 Bunková stena kvasiniek

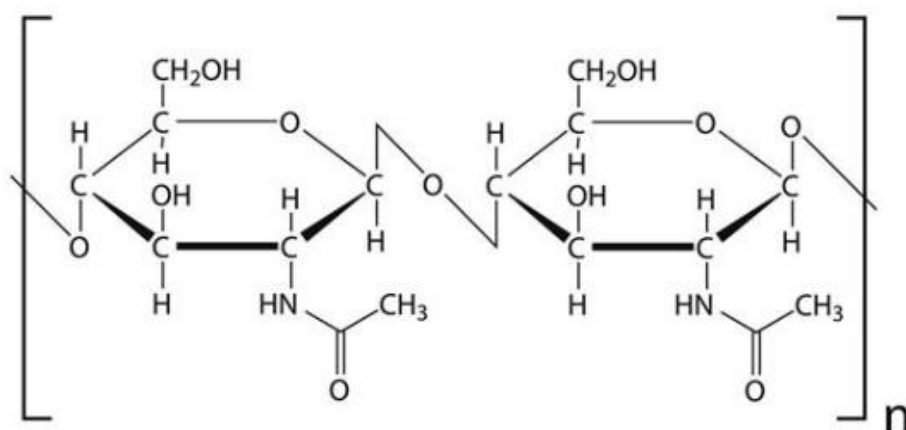
Bunková stena kvasiniek predstavuje kompozit zložený z rôznych častí. Najzastúpenejším komponentom sú polysacharidy, ktoré predstavujú približne 80 % hmotnosti z celkovej bunkovej steny. Druhým najzastúpenejším komponentom sú proteíny, ktoré tvoria 3-20 %. Lipidy, pigmenty, soli sú prítomné v malých množstvách [17]. Vonkajšiu vrstvu tvoria manoproteíny, pod ktorou je vrstva β -glukánov. Najvnútornejšou vrstvou je chitín. Prierez bunkovej steny je znázornený na obrázku č. 2.



Obrázok 2: Prierez bunkovej steny kvasiniek a jej jednotlivé komponenty [18]

2.3.1 Chitín

Chitín, polysacharid, ktorý je tvorený molekulami N-acetyl-D-glukózamínu spojenými β -(1,4)-glykozidovými väzbami je v mikrobiálnom svete viac rozšírený ako chitosán. Chitosán vzniká deacetyláciou chitínu pôsobením chitín deacetyláz. V bunke *C. albicans* je menej ako 5 % chitínu deacetylovaného na chitosán, zatiaľ čo u *Basidiomycetes* a *Zygomycetes* sú deacetylované viac ako dve tretiny chitínu. Chitínová deacetylácia môže spôsobiť väčšiu elasticitu polyméru [19]. Bunkové steny kvasiniek *Ascomycetes* a *Deuteromycetes* obsahujú hlavne chitín, ktorý je zodpovedný za tuhosť bunkových stien. V týchto prípadoch je chitín zložkou bunkovej steny, ale v iných prípadoch môže byť zapojený do bunkového delenia a inak prakticky chýba. Môže sa vyskytovať v niekoľkých polymorfných formách, ale najbežnejšou formou je α -chitín, v ktorom jednotlivé reťazce agregujú do mikrofibríl, pričom vodíkové väzby držia susedné reťazce usporiadané antiparalelne, vďaka čomu vzniká veľmi pevná štruktúra. Množstvo chitínu v kvasinkách sa pohybuje od 2 do 60 % hmotnosti bunkovej steny a závisí od druhu kvasiniek. Za syntézu chitínu sú zodpovedné chitín syntázy, ktoré využívajú ako substrát UDP-N-acetylglukozamín [20].

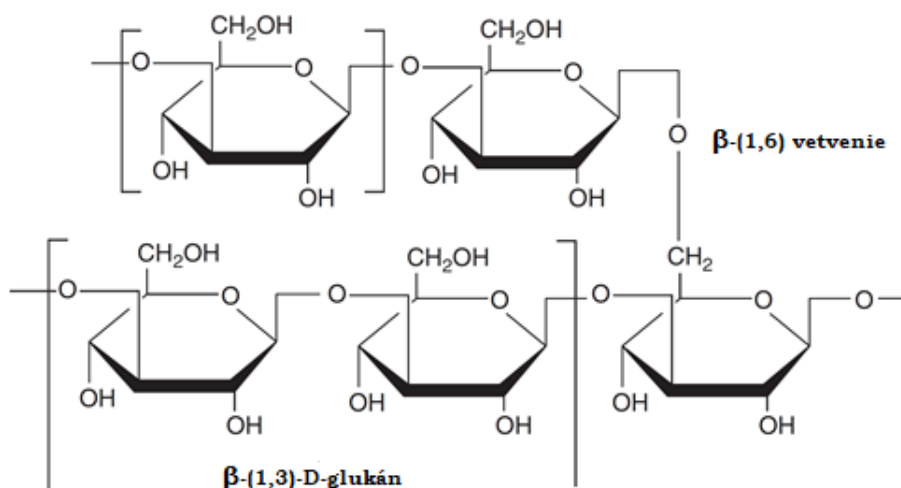


Obrázok 3: Štruktúra chitínu [21]

Jednoduchosť štruktúry chitínu odporuje komplexnému biosyntetickému procesu. Chitín je syntetizovaný skupinou enzýmov chitín syntáza, v rámci ktorej môžeme rozlíšiť na základe podobnosti aminokyselinových sekvencií sedem tried [19]. Chitín syntázy sú membránovo integrované enzýmy obsahujúce niekoľko transmembránových domén, ktoré sú určené ako transportný kanál pre chitín a jeho ukladanie na vonkajšej strane membrány [22]. Jednotlivé chitín syntázy sa podieľajú rôznym spôsobom na tvorbe septa, raste a vývoji. Triedy I, II a IV sa nachádzajú najmä v pučiach kvasiniek, zatiaľ čo triedy III a V-VII sa nachádzajú vo vláknitých a dimorfných hubách [23].

2.3.2 β -(1,3)-glukán

Glukány s opakujúcimi sa jednotkami β -(1,3)-viazanej glukózy sú v prostredí ubikvitné. Majú štruktúrnu, zásobnú alebo ochrannú funkciu spojenú s rezistenciou na liečivá a nachádzajú sa v určitých vyšších rastlinách, kvasinkách, riasach, hubách a baktériách. β -(1,3)-glukány bunkových stien kvasiniek sú rozvetvené polysacharidy obsahujúce bočné reťazce β -(1,6)-viazanej glukózy [24]. Štruktúra β -(1,3)-glukánu je znázornená na obrázku č. 4.



Obrázok 4: Štruktúra kvasinkového vetveného glukánu [25]

β -(1,3)-glukány sú z hľadiska obsahu v bunkovej stene dominantnou zložkou. V porovnaní s β -(1,6)-glukánom, tvoria približne 65-90 % celkového obsahu. Funkcia týchto zlúčenín sa líši podľa stupňa vetvenia a molekulovej hmotnosti. Štrukturálne vlastnosti a lokalizácia polysacharidov v bunke sú podstatné pre definovanie ich biologickej aktivity. Syntéza β -(1,3)-glukánu vykazuje v určitých bodoch podobnosť so syntézou chitínu. Ide o viacstupňový proces skladajúci sa z iniciácie, predĺženia glukánových reťazcov a vetvenia. Reťazce sú syntetizované v cytoplazme a následne prenesené do periplazmatického priestoru pomocou transmembránového enzýmového komplexu. Následné modifikácie reťazca prebiehajú v periplazmatickom priestore. Vedľajšie reťazce pripojené cez β -(1,6) vetvenie predstavujú 3-10 % z celkového β -(1,3)-glukánu. Za syntézu β -(1,3)-glukánu je zodpovedná GLS – glukán syntáza, ktorá ako substrát využíva UDP-glukózu a prenáša glukózové zvyšky k rastúcemu glukánovému reťazcu. Molekulová hmotnosť GLS v kvasinkách je približne 200 kDa a pozostáva z 2 podjednotiek, katalytickej FKS1 alebo FKS2 a regulačnej RHO. Podjednotka RHO má nízku molekulovú hmotnosť a vykazuje aktivitu guanozíntrifosfatázy. Katalytická podjednotka FKS1 je exprimovaná za optimálnych podmienok, podjednotka FKS2 pri obmedzení zdroja uhlíka alebo pri vystavení vysokým teplotám [26].

2.3.3 β -(1,6)-glukán

β -(1,6)-glukán vytvára väzby s β -(1,3)-glukánom, chitínom a GPI kotvou, ktorej úlohou je kovalentne viazať manoproteíny bunkovej steny. β -(1,6)-glukán je syntetizovaný pomocou β -(1,6)-glukán syntázy. Existujú gény, ktoré ovplyvňujú syntézu β -(1,6)-glukánu, patria k nim *KRE5*, *BIG1*, *SKN1*, *ROT1* atď. Úlohou *ROT1* je kontrola skladania proteínov, ktoré regulujú výstup proteínov z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. Proteíny Kre6 a Skn1, lokalizované v Golgiho aparáte, sú dôležité pre normálnu syntézu β -(1,6)-glukánu a vykazujú aktivitu glykozylových hydroláz alebo transglykozyláz. Narušenie Kre9 a Knh1 by mohlo mať letálny účinok. Tieto enzýmy boli rozpoznané ako potrebné pre syntézu β -(1,6)-glukánu z hľadiska účinku β -(1,6)-glukán syntázy alebo na zosieťovanie polyméru na komponenty bunkovej steny [27].

2.3.4 Manoproteíny

Na povrchu bunkovej steny kvasiniek sa nachádzajú manoproteíny, ktoré tvoria približne tretinu hmotnosti bunkovej steny. Manoproteíny sú glykozylované polypeptidy, ktorých 50 až 95 % tvoria sacharidy. Pozostávajú z 50 až 200 manózových podjednotiek viazaných α -1,6-väzbou, na ktoré môžu byť viazané krátke bočné reťazce. V bunkových stenách sú často prítomné zvyšky serínu a treonínu [28]. Ako v prípade všetkých glykozylovaných proteínov eukaryotických organizmov, pridanie sacharidových zvyškov je iniciované v endoplazmatickom retikule, po ktorom nasleduje modifikácia v Golgiho aparáte. Po týchto krokoch nasleduje kovalentné spojenie s glukánovými polymérmi, ktoré sa viažu na GPI kotvu [29]. V priebehu O-glykozylácie môže dôjsť k prerušeniu, čo má za následok nesprávnu tvorbu manoproteínov a zníženie obsahu β -(1,6)-glukánu, ktorého sekrécia závisí od asociácie s O-glykozylovanými manoproteínmi [28]. Hlavnou funkciou manoproteínov je ochrana vnútornej vrstvy bunkovej steny pred vplyvom degradačných enzýmov. Vďaka prítomnosti fosfodiesterových väzieb obsahuje bunkový povrch negatívny náboj. Bočné reťazce sú zodpovedné za hydrofilné vlastnosti, čo pomáha pri zadržiavaní vody a ochrane pred vyschnutím. Rozlišujeme dve skupiny manoproteínov. Prvou skupinou sú manoproteíny závislé od GPI, ktoré sú nepriamo spojené s β -(1,3)-glukánom prostredníctvom β -(1,6)-glukánu. Druhou skupinou sú Pir proteíny, ktoré sú pravdepodobne priamo spojené s β -(1,3)-glukánom [30].

2.4 Klasifikácia enzýmov katalyzujúcich prenos glykozylovej skupiny

Podľa databázy CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) je možné rozlíšiť 5 tried enzýmov, ktoré katalyzujú rozklad, syntézu glykozidických väzieb alebo modifikáciu glykokonjugátov. Prvou triedou sú glykozidové hydrolázy GH, druhou triedou sú glykozyltransferázy GT, treťou triedou sú karbohydrátesterázy CE, štvrtou triedou sú polysacharidové lyázy PL a poslednou, piatou triedou sú auxiliárne aktivity AA, do ktorej patria redoxné enzýmy, ktoré spolupracujú s inými enzýmami [31].

Glykozyltransferázy GT, sú enzýmy zodpovedné za prenos sacharidových skupín z aktivovaných donorových molekúl na akceptorové molekuly, vďaka čomu dochádza k vytvoreniu glykozidickej väzby. Všeobecne povedané, GT pôsobia postupne, oligosacharidový produkt jedného enzýmu slúži ako akceptorový substrát pre následné pôsobenie iných glykozyltransferáz. Konečným výsledkom je lineárny alebo rozvetvený polymér, ktorý je zložený z navzájom spojených monosacharidov [32]. Podľa databázy CAZy sú GT rozdelené do 110 rodín.

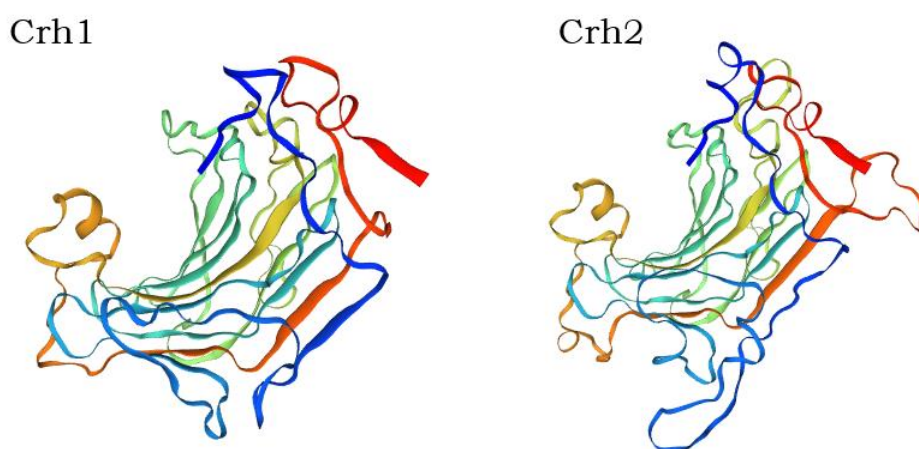
Glykozidové hydrolázy GH, sú skupinou enzýmov, ktoré katalyzujú štiepenie glykozidických väzieb. GH sa nachádzajú takmer vo všetkých živých organizmoch okrem niektorých z domény Archea a niektorých jednobunkových parazitických eurakyotov. Mnoho GH vykazuje širokú substrátovú špecifitu, čo sťažuje ich klasifikáciu [33]. GH vo väčšine prípadov katalyzujú hydrolýzu glykozidických väzieb medzi glykozidom a aglykónom, čo má za následok vytvorenie redukujúceho cukru a voľného aglykónu. Akceptorom reakcie je voda. V dôsledku jej koncentrácie za fyziologických podmienok býva rovnováha posunutá smerom k hydrolýze. V niektorých prípadoch môže byť akceptorom namiesto vody iný sacharid alebo fosfát. Vtedy sú reakcie katalyzované zvláštnymi GH enzýmami, ktoré patria medzi transglykozylázy alebo fosforylázy. Transglykozylačné reakcie môžu prebiehať ako homotransglykozylácia alebo heterotransglykozylácia. Ak je molekula donora a akceptora rovnakého typu, jedná sa o homotransglykozyláciu. V prípade, že ide o štrukturálne odlišné molekuly, je reakcia označovaná ako heterotransglykozylácia [34]. Podľa databázy CAZy sú jednotlivé enzýmy na základe podobnosti aminokyselinových sekvencií rozdelené do niekoľkých skupín, tzv. „rodín“ a „subrodín“. Skupinu glykozidových hydroláz tvorí až 167 rodín.

Bolo identifikovaných množstvo enzýmov, ktoré sa podieľajú na prestavbe bunkovej steny kvasiniek. Tieto enzýmy patria medzi transglykozylázy a katalyzujú dvojstupňovú reakciu. V prvom kroku fungujú ako glykozylové hydrolázy, štiepia glukány, chitíny, manoproteíny a vytvárajú kovalentnú väzbu medzi fragmentom s pôvodným neredukujúcim koncom rozštiepeného polysacharidu a enzýmom – tzv. „medziprodukt“ enzým-polysacharidový komplex. V druhom kroku vytvárajú väzbu medzi týmto fragmentom a druhým (poly)sacharidom. Týmto spôsobom môžu vytvárať väzby medzi glukánmi, chitínom a glykoproteínmi bunkovej steny, teda ju predstavovať v dôsledku predlžovania alebo skracovania štrukturálnych polysacharidov. Najbežnejšími GH „rodinami“ podieľajúcimi sa na prestavbe, prípadne zosieťovaní fungálnej bunkovej steny sú GH 16, GH 17, GH 18, GH 72

a GH76 [35] [36] [37]. V rámci diplomovej práce sú skúmané enzýmy Phr1, Phr2 (rodina GH 72) a Crh2 (rodina GH 16).

2.4.1 Rodina GH 16

Pre normálny rast buniek je nevyhnutná prestavba bunkovej steny, ktorá zahŕňa prerušenie priečných väzieb, inkorporáciu novo syntetizovaného materiálu do bunkovej steny a vytvorenie nových priečných väzieb medzi dvomi rôznymi zložkami prostredníctvom transglykozylácie. Enzýmy, ktoré sú zodpovedné za tieto procesy v kvasinkách, patria do rodiny GH 16, konkrétne do skupiny Crh enzýmov [38]. V bunke *S. cerevisiae* sú enzýmy Crh potrebné na tvorbu priečných väzieb medzi chitínom a glukánmi [39]. Výsledkom delécie Crh1 a Crh2 je citlivosť na zlúčeniny ako Kongo červená alebo calcofluor white, ktoré interferujú s bunkovou stenou. V prípade dvojitej delécie vykazujú mutanty dvojnásobné zvýšenie množstva glukánu z bunkovej steny rozpusteného v alkáliách v porovnaní so štandardným typom, čo hovorí, že je viazané menšie množstvo glukánu na chitín [40]. Inaktivácia Crh enzýmov vedie k zvýšenej elasticite bunkovej steny, naopak, ich zvýšená expresia má za následok zvýšenú ochranu pred osmotickým stresom. Ďalšou fungálnou reakciou voči stresu je indukcia syntézy chitínu [41]. Štruktúra Crh1 a Crh2 je znázornená na obrázku č. 5.

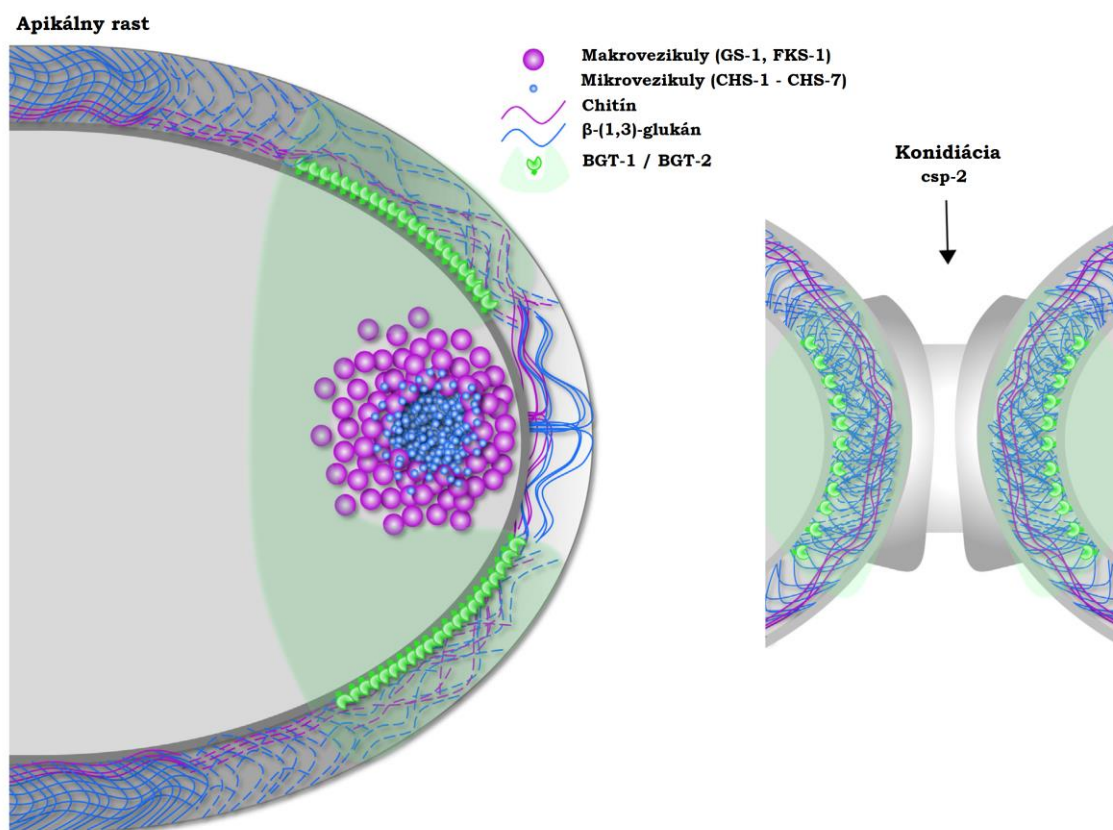


Obrázok 5: Štruktúry enzýmov Crh1 a Crh2 [42] [43]

2.4.2 Rodina GH 17

Do rodiny GH 17 sú zaradené enzýmy bunkovej steny Bgt1, Bgt2, Bgt3 a Scw4 a Scw11 mikroorganizmov *S. cerevisiae* a *Aspergillus fumigatus*. Delécia *BGT3*, *SCW4* a *SCW11* má vplyv na pokles konidiácie spojený s vyššou úmrtnosťou a abnormálnym konidiálnym tvarom. Enzýmy Bgt3, Scw4 a Scw11 sú dôležité pre integritu bunkovej steny a môžu mať antagonistické funkcie voči Bgt1 a Bgt2. Účinok enzýmov *A. fumigatus*, Bgt1 a Bgt2, je znázornený na obrázku č. 6. Bgt1 a Bgt2 štiepia laminaribiózu z β -(1,3)-glukánu a prenášajú ju

na neredukujúci koniec druhého β -(1,3)-glukánového akceptora s β -(1,6)-väzbou za vytvorenia rozvetveného polyméru [44].



Obrázok 6: Model účinku Bgt1 a Bgt2 v konídii. Na konci konídie sú chitín a β -(1,3)-glukány syntetizované enzýmami, ktoré sa po akumulácii v Spk (Spitzenkörper špička) začlenia do cytoplazmovej membrány. Naopak, v protiaľhlej časti sú β -(1,3)-glukány a chitín hydrolyzované, vďaka čomu sa získavajú prístupné konce na ďalšie zosieťovanie. Bgt1 a Bgt2 majú významnú úlohu pri hydrolyze glukánov s cieľom umožniť vytvorenie tenkých spojení medzi konídiami [45]

2.4.3 Rodina GH 18

Rodina GH 18 je distribuovaná vo všetkých ríšach vrátane baktérií, vírusov, húb, rastlín a zvierat [46]. Členovia rodiny GH 18 sa delia na enzymaticky aktívne chitinázy a enzymaticky neaktívne lektíny alebo proteíny podobné chitinázam. Chitinázy sa skladajú z katalytickej domény a chitínovej domény, ktorá je bohatá na cysteín. Na N-konci sa nachádza katalytická doména, chitínová doména sa nachádza na C-konci [47]. Základnou funkciou enzýmov rodiny GH 18 je hydrolyza chitínu. Okrem toho majú rôzne fyziologické funkcie, napr. v *S. cerevisiae* je prítomnosť rodiny GH 18 potrebná k oddeleniu buniek počas rastu. V genómoch rôznych organizmov sa nachádza rôzny počet členov GH 18, tabuľka č. 1 uvádza príklady. Napr. v *S. cerevisiae* sú identifikované dva enzýmy rodiny GH 18, v *A. nidulans* 18, v *Caenorhabditis elegans* 35 členov, v *Drosophila melanogaster* 17 a v *Homo sapiens* 6 členov [48]. Jednotlivé

enzýmy je možné zatriediť do fylogenetických zoskupení A, B a C (zoskupenie C je v tabuľke č. 1 zlúčené so zoskupením A). Tieto skupiny sa delia na základe prítomnosti chitínovej inzerčnej domény CID, ktorá je prítomná v zoskupení A.

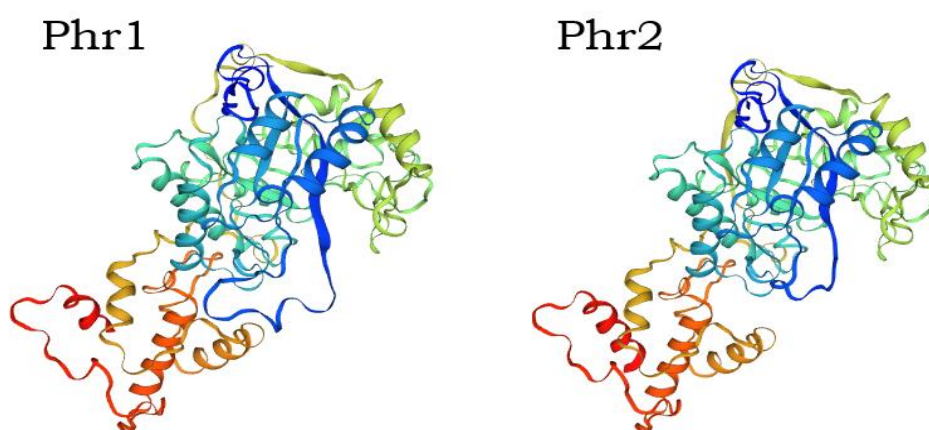
Tabuľka 1: Počet enzýmov rodiny GH18 rozdelených do zoskupení A a B u rôznych organizmov [49]

Druh	Trieda	Zoskupenie A	Zoskupenie B	Celkový počet enzýmov rodiny GH18
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Mucormycotina</i>	9	6	15
<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomycetes</i>	2	3	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomycetes</i>	1	1	2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Saccharomycetes</i>	1	2	3
<i>Ajjelomyces capsulatus</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	7	2	9
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	6	3	9
<i>Gibberella zeae</i>	<i>Sordariomycetes</i>	16	3	19
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Sordariomycetes</i>	8	4	12
<i>Copronopsis cinerea</i>	<i>Agaricomycetes</i>	7	1	8

2.4.4 Rodina GH 72

Rodinu GH 72 tvoria β -1,3-glukanozyltransglykozylázy, ktoré sú schopné meniť dĺžku β -1,3-glukánov, takže sú dôležité pri určovaní veľkosti β -1,3-glukánu včleneného do bunkovej steny. Tieto enzýmy sú najzastúpenejšími proteínmi vyskytujúcimi sa v bunkovej stene kvasiniek, napr. v bunkovej stene *S. cerevisiae*, *C. albicans* alebo huby *A. fumigatus*. Genómy *S. cerevisiae* a *C. albicans* obsahujú päť génov pre enzýmy GH rodiny 72 označené ako *GAS* alebo *PHR*. V prípade huby *Aspergillus fumigatus* rozoznávame gény *GEL* [50]. Proteíny Gas/Gel pozostávajú zo signálnej sekvencie, katalytického jadra a domény bohatej na cysteín (tzv. modul viažuci sacharidy označený ako CBM43) alebo domény bohatej na serín a treonín, po ktorej nasleduje kotva GPI. Na základe prítomnosti alebo absencie domény CBM43 rozoznávame rodinu GH 72⁺, ktorá obsahuje doménu CBM43 a GH72⁻ bez spomínanej

domény. Genóm kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje gény kódujúce 5 proteínov označených ako Gas1 až Gas5. Gas1 a Gas2 patria do rodiny GH 72⁺. S výnimkou Gas3 bola transglykozylačná aktivita potvrdená u všetkých enzýmov [51]. V prípade kvasinky *C. albicans* sú gény *PHR1* a *PHR2* dôležité pre normálnu morfológiu a virulenciu kvasiniek, okrem nich sú prítomné aj gény *PHR3*, *PGA4* a *PGA5*. Význam *PHR3* a *PGA5* nie je úplne známy, úroveň transkripcie oboch je dosť nízka [52]. Expresia enzýmov Phr1 a Phr2 je regulovaná okolitým pH. Expresia Phr1 prebieha pri pH vyššom ako 5,5 a je potlačená v kyslých podmienkach, kedy je nahradená expresiou Phr2. Táto regulácia závislá od pH je rozhodujúca pre patogenézu hostiteľa [53]. Štruktúra Phr1 a Phr2 je znázornená na obrázku č. 7. Na rozdiel od Phr1 a Phr2 je expresia ostatných členov rodiny nezávislá od okolitého pH, sú konšitutívne a slabo exprimované [54].



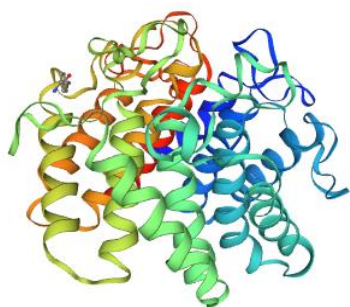
Obrázok 7: Štruktúry enzýmov Phr1 a Phr2 [55] [56]

Gel, rodina GPI-zakotvených proteínov je ďalšou skupinou glukanozyltransferáz. Táto rodina má vplyv na predlžovanie glukánových reťazcov pomocou štiepenia vnútornej väzby β -1,3-glukánu a prenesením fragmentu s pôvodným neredukujúcim koncom na neredukujúci koniec iného β -1,3-glukánu. Existuje celkom sedem génov kódujúcich Gel. V prípade delécie *GEL1* nedochádza k fenotypovým rozdielom od rodičovského kmeňa, delécia *GEL2* alebo delécia *GEL1* a *GEL2* je spojená s rastovými problémami, nie normálnou konidiogenezou a hypovirulenciou. Delécia *GEL4* je letálna, čo naznačuje, že *GEL4* je dôležitý pre životaschopnosť buniek. Delécia *GEL7* spôsobuje defekty konidácie. *A. fumigatus* uprednostňuje reštrukturalizáciu bunkovej steny pomocou „recyklácie“ β -1,3-glukánu a to tak, že glukány sú z miest, kde už nie sú potrebné odstránené a podľa potreby zabudované na požadované miesta. Tento prístup prestavby bunkovej steny je energeticky úspornejší v porovnaní s novou biosyntézou β -1,3-glukánových reťazcov [57].

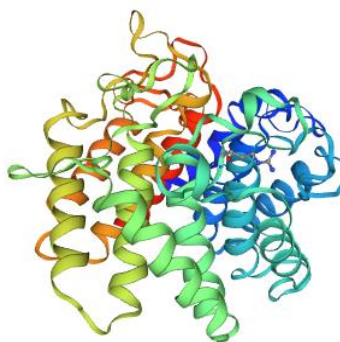
2.4.5 Rodina GH 76

Enzýmy rodín GH 76 a GH 72 sa nachádzajú v celej fungálnej ríši. GH 76 sú dôležité pri zosieťovaní glykoproteínov v bunkovej stene. Príkladom môžu byť mananázy Dfg5 a Dcw1 (GH 76) z mikroorganizmu *Neurospora crassa*. Ich substrátom je N-galaktomanán, ktorý je prítomný v glykoproteínoch a ktorý zosieťujú do glukán-chitínovej štruktúry bunkovej steny. Rovnako ako v prípade *N. crassa* sú enzýmy GH 76 dôležité aj pre *S. cerevisiae* a *C. albicans*. Strata α -(1,6)-mananáz u *S. cerevisiae* je letálna. *C. albicans* neobsahuje galaktomanán, ale má N-viazaný manooligosacharid s bočnými reťazcami pripojenými k manózam v polohe 2. *C. albicans* využíva na zosieťovanie bunkovej steny β -(1,6)-glukán [58]. Štruktúry enzýmov Dfg5 a Dcw1 sú znázornené na obrázku č. 8.

Dcw1



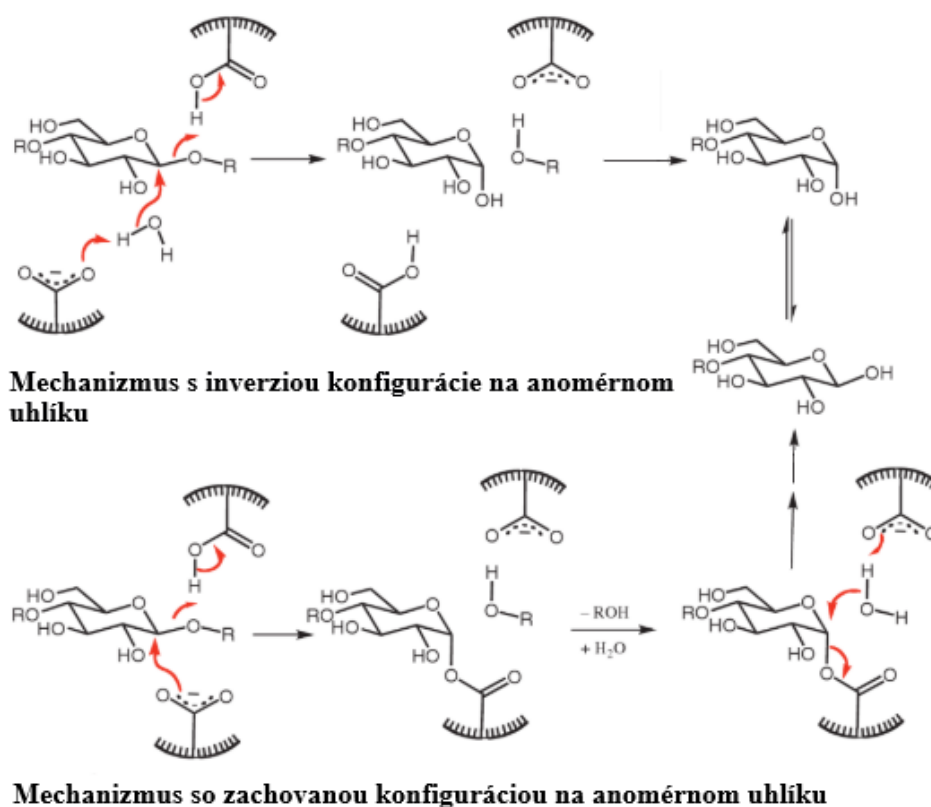
Dfg5



Obrázok 8: Štruktúry enzýmov Dcw1 a Dfg5 [59] [60]

2.5 Mechanizmus reakcií GH enzýmov

GH enzýmy majú schopnosť katalyzovať hydrolýzu glykozidov, čím dochádza k vzniku hemiacetálov prípadne hemiketálov sacharidov a aglykónov. Môžu byť označované ako exo- alebo endo-hydrolázy, čo reprezentuje štiepenie substrátov od ich koncov alebo náhodne. Enzýmy GH rodín môžu reagovať dvomi spôsobmi, mechanizmom so zachovanou konfiguráciou na anomérnom uhlíku, tzv. „retaining“ mechanizmus a mechanizmom s inverziou konfigurácie na anomérnom uhlíku, tzv. „inverting“ mechanizmus (obrázok č. 9).



Obrázok 9: Základný prehľad "inverting" a "retaining" mechanizmu GH enzýmov [61]

V posledných rokoch sa študujú rôzne modifikácie týchto dvoch mechanizmov. Dôvodom je to, že niektoré rodiny nevyužívajú len jeden z týchto mechanizmov, napr. GH 23, GH 83 a GH 97 využívajú „retaining“ aj „inverting“ mechanizmus. Niektoré rodiny GH využívajú „retaining“ mechanizmus, avšak v prítomnosti substrátu s aktivovanými odstupujúcimi skupinami využívajú „inverting“ mechanizmus [62][63]. Premenou katalytického nukleofilu na malú, nenukleofilnú aminokyselinu, napr. serín, alanín, glycín, je možné docieľiť inaktívny enzým, ktorý je možné účinkom azidu alebo fluoridu premeniť na α -D-glukozid, čím sa zmení mechanizmus enzýmu na „inverting“ [64].

2.5.1 Mechanizmus GH s inverziou konfigurácie na anomérnom uhlíku

GH enzýmy pracujúce mechanizmom s inverziou konfigurácie na anomérnom uhlíku používajú jednostupňový proces, v ktorom dva zvyšky karboxylových skupín pôsobia ako kyselina a báza, t.j. protonizujú glykozidový kyslík a deprotonizujú nukleofilnú molekulu vody, čo má za následok stereoinverziu po hydrolýze [65].

Ak enzým pracujúci „inverting“ mechanizmom katalyzuje transglykozylnú reakciu, produktom reakcie je invertovaný anomér východiskového glykozidu. Transglykozylná aktivita u „inverting“ hydroláz nie je bežná. Enzýmy katalyzujú syntézu oligosacharidu zvrátením hydrolytickej reakcie. V prítomnosti akceptorov voľného cukru a alkoholu môže vratná reakcia produkovať glykozid [66]. Keďže sa enzýmové reakcie GH rodín zvyčajne uskutočňujú vo vodných roztokoch, je zvrátenie hydrolytickej reakcie kvôli veľkému množstvu molekúl vody takmer nemožné. Vratná reakcia teda obvykle poskytuje iba malý výtťažok a je dosiahnuteľná iba pri vysokých koncentráciách produktov [67].

Medzi GH rodiny pracujúce „inverting“ mechanizmom patria napr. GH 15, GH 37, GH 63, GH 65, GH 97. Zástupcami rodiny GH 15 sú glukoamyláza, glukodextranáza alebo α,α -trehaláza. Rodinu GH 63 zastupuje α -glukozidáza, α -(1,3)-glukozidáza. Do rodiny GH 65 patrí väčšie množstvo fosforyláz, napr. maltóza fosforyláza, trehalóza fosforyláza, nigeróza fosforyláza.

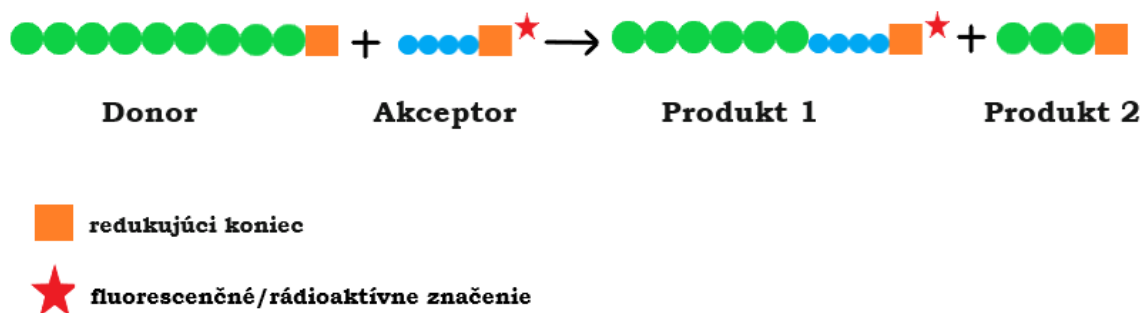
2.5.2 Mechanizmus GH so zachovanou konfiguráciou na anomérnom uhlíku

Druhým typom mechanizmu je „retaining“ mechanizmus so zachovanou konfiguráciou na anomérnom uhlíku. Dochádza k hydrolýze glykozidovej väzby pomocou nukleofilnej katalýzy. Typ nukleofilu sa môže líšiť, buď ide o enzymatický nukleofil alebo o nukleofil prítomný v substráte. Koshland pôvodne navrhol, že hydrolýza so zachovanou konfiguráciou musí prebehnúť v dvoch krokoch, z ktorých každý zahŕňa inverziu anomérnej stereochemie prostredníctvom zapojenia nukleofilu, ktorý figuruje ako medziprodukt v prvom kroku reakcie a ktorý je v druhom kroku hydrolyzovaný [65]. V prvom kroku reakcie je substrát viazaný na aktívne miesto, nukleofilná skupina aktívneho miesta enzýmu (histidín alebo kyselina glutámová) napáda anomérny uhlík substrátu. Protonizáciou aglykónu pomocou kyslého protónu so sprievodným účinkom štiepenia glykozidovej väzby a tvorby esterovej väzby dochádza k vzniku medziproduktu kovalentného esteru glykozyl-enzým s anomérnou inverziou na C1. V ďalšom kroku hydroxylová skupina molekuly vody (v prípade hydrolytickej reakcie) alebo z rôznych sacharidových zvyškov (v prípade transglykozylnéj reakcie) atakuje esterovú väzbu medziproduktu, ktorú sprevádza opätovná konverzia konfigurácie anomérneho uhlíka, t.j. konečný produkt má rovnakú anomérnu konfiguráciu ako počiatočný substrát [66]. V prípade mechanizmu so zachovaním konfigurácie na anomérnom uhlíku je poloha donora protónov rovnaká a nukleofilná katalytická báza je v blízkosti anomérneho uhlíka sacharidu. V porovnaní s „inverting“ mechanizmom je báza bližšie. Rozdiel

vzdialeností medzi katalytickými zvyškami je u „retaining“ mechanizmu ~5,5 Å a ~10 Å u „inverting“ mechanizmu [68].

2.5.3 Transglykozylácia

Ako bolo spomenuté v predchádzajúcej časti, pre transglykozylačnú reakciu je typický dvojstupňový mechanizmus so zachovanou konfiguráciou na anomérnom uhlíku. Prvým krokom je interakcia enzýmu s donorovým substrátom, rozštiepenie donora, vytvorenie kovalentného komplexu medzi fragmentom donora s pôvodným neredukujúcim koncom a uvoľnenie fragmentu, ktorý je nositeľom pôvodného redukujúceho konca sacharidu. V druhom kroku sa k naviazanému fragmentu donora kovalentne naviaže neredukujúci koniec druhého poly- alebo oligosacharidu a produkt sa uvoľní. Schéma reakcie je znázornená na obrázku č. 10.



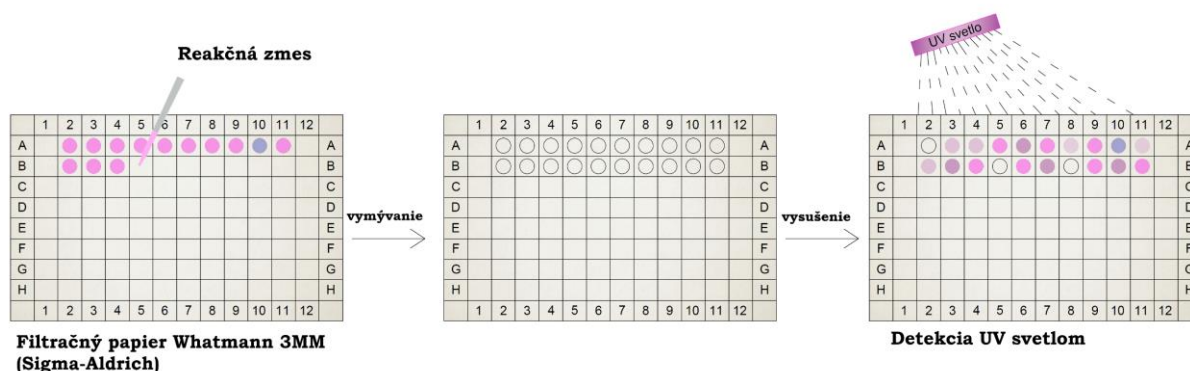
Obrázok 10: Schéma transglykozylácie

2.6 Spôsobý stanovenia transglykozylačných aktivít

Z popisu transglykozylačnej reakcie vyplýva, že bežné metódy stanovenia aktivít sa na transglykozylázy nedajú aplikovať. Z tohto dôvodu sa vyvinuli špeciálne metódy, ktoré sú väčšinou založené na rôznych molekulových hmotnostiach donorových (polymér) a akceptorových substrátov (oligosacharidy) s rádioaktívnym alebo fluorescenčným značením redukujúceho konca akceptora. Pri objave prvej typickej transglykozylázy v rastlinách boli použité rádioaktívne značené oligosacharidy [69] [70].

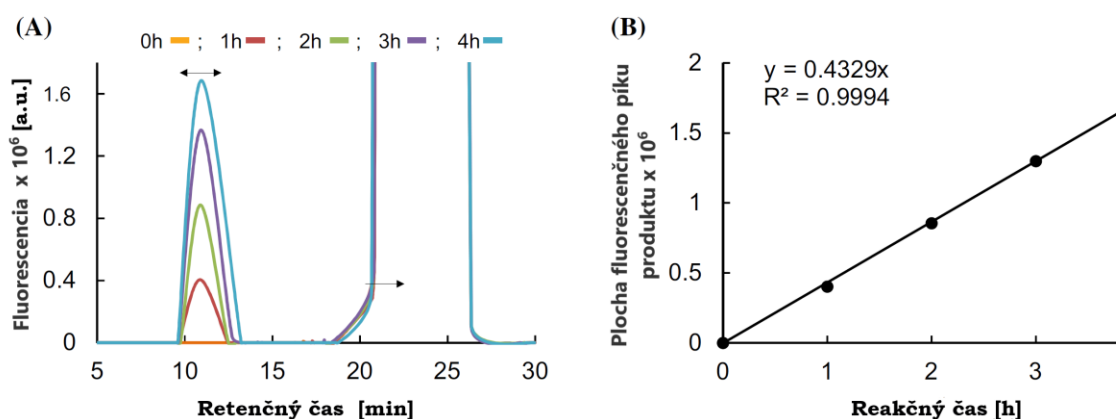
Rádiometrické testy sú založené na konverzii rádioaktívne značených substrátov na značené produkty a na meraní rádioaktivity produktu alebo zvyškového substrátu [71]. Najčastejšie používanými rádioaktívnymi izotopmi sú ^{14}C , prípadne ^3H alebo ^{32}P . Nevýhodou metódy je jej vyššia cena vzhľadom na použitie rádioaktívnych značiek a taktiež prináša aj zdravotné riziká.

Fry (1997) navrhol fluorescenčnú kvalitatívnu „dot-blot“ metódu na stanovenie aktivity prvej známej transglykozylázy, xyloglukánendotransglykozylázy (XET), ktorá sa nachádza v rastlinných bunkových stenách. Podstatou tejto metódy je využitie fluorescenčne značených oligosacharidov ako akceptorov transglykozylačnej reakcie. Reakčná zmes obsahovala xyloglukán (donor), sulforodamínom značený xyloglukánoligosacharid (akceptor). Produkty reakcie sa nanášali na filtračný papier Whatmann. Vysokomolekulárny značený produkt sa pevne viazal na celulózu, kým nezreagovaný akceptor sa z nej vymyl. Naviazanú fluorescenciu vizualizoval Fry pod UV svetlom [72]. Neskôr Mazán a kol. (2011) nanášali vzorky na Whatmann upravený na rozmer Elisa platní a transglykozylačnú reakciu vyhodnotili kvantitatívne meraním na fluorescenčnom spektrofotometri [73]. Fluorescenčná „dot-blot“ metóda je znázornená na obrázku č. 11.

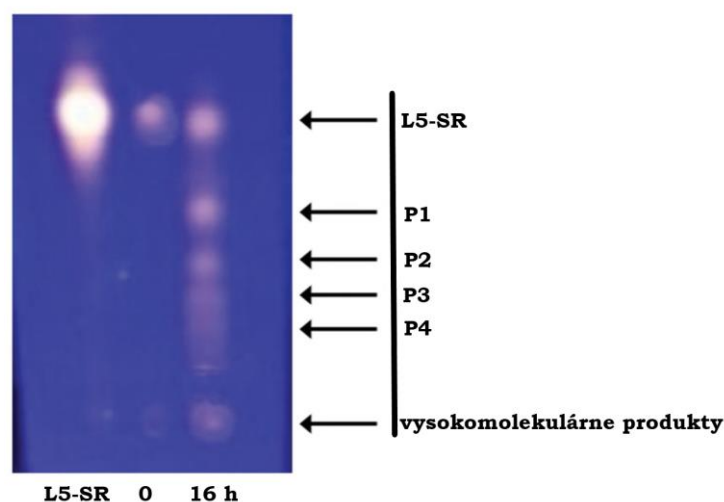


Obrázok 11: Schéma fluorescenčnej "dot-blot" metódy

Medzi často využívané metódy merania transglykozylačnej aktivity patrí meranie založené na delení nízkomolekulárnych akceptorov od vysokomolekulárnych produktov na kolóne s molekulovým sitom zapojenej do zariadenia HPLC [74]. Detekcia produktov je založená na tom, aký typ značenia bol použitý pre akceptorový substrát, napr. fluorescenčné značenie ponúka možnosť využitia HPLC s fluorescenčným detektorom, kedy sú transglykozylačné aktivity vyjadrené pomocou merania nárastu plochy píku fluorescencie v priebehu reakcie (obrázok č. 12). Výhodou metódy je presnosť, citlivosť a možnosť automatizácie [75]. Ďalšími možnosťami testovania transglykozylačných aktivít sú papierová chromatografia [76] alebo tenkovrstvová chromatografia (obrázok č. 13) [77].



Obrázok 12: Chromatografický profil transglykozylácie katalyzovanej enzýmom TmXET6.3. (A) Syntéza fluorescenčne značených produktov v závislosti na čase. (B) Lineárna závislosť plochy píku produktu na reakčnom čase [78]



Obrázok 13: TLC platnička s rozlíšenými produktami P1-P4 transglykozylačnej reakcie katalyzovanej Phr1 [77]

Princípom viskozimetrickej metódy je redukcia molekulovej hmotnosti vysokomolekulového substrátu, ktorý interaguje s enzýmom, čo má za následok zníženie viskozity [79]. Mazán et al. (2013) využili na zistenie relatívnej viskozity mikroviskozimetre Cannon-Manning. Reakčná zmes obsahovala CM-chitín, citrátový tlmivý roztok a aj enzýmový preparát. Relatívna viskozita bola vypočítaná podľa podielu času, ktorý potrebovala na pretečenie kvapaliny medzi ryskami viskozimetra reakčná zmes na začiatku reakcie a po zvolených dobách inkubácie.

Sulová et al. opísali kolorimetrickú metódu pre stanovenie transglykozylačnej aktivity XET [80]. Princípom je degradácia molekúl donora, xyloglukánu, čím dochádza k vymiznutiu modro-zeleného komplexu jód-xyloglukán.

2.7 Fungálne infekcie

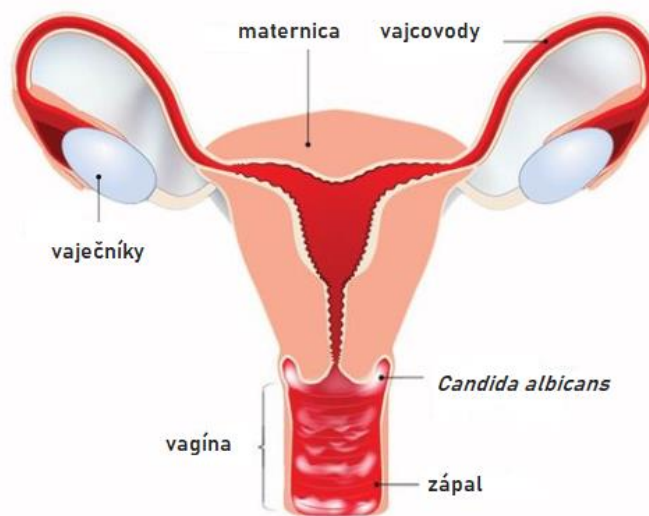
Spomedzi 100 000 druhov húb, ktoré boli opísané, je menej ako 500 spojených s ľudským ochorením a nie viac ako 100 je schopných spôsobiť infekciu u inak zdravých jedincov. Až na pár výnimiek pochádzajú infekcie človeka z vonkajšieho zdroja v prostredí a dajú sa získať inhaláciou, požitím alebo transplantáciou. Jednotlivé infekcie môžu byť zaradené do niekoľkých skupín na základe počiatočného miesta infekcie [81]. Prvou skupinou sú povrchové mykózy, druhou skupinou sú subkutánne mykózy a treťou skupinou sú systémové mykózy. Povrchové mykózy sa obmedzujú na okrajové vrstvy kože, nechtov, vlasov a sliznice. Medzi najznámejšie povrchové infekcie patria dermatofytózy a povrchové formy kandidózy. Povrchové mykózy napádajú milióny ľudí, bývajú ľahko diagnostikované a obvykle reagujú dobre na liečbu. Druhá skupina, subkutánne mykózy, postihuje podkožné tkanivá a do organizmu sa dostávajú po traumatickej inokulácii. Zdrojom bývajú mikroorganizmy, ktoré sa bežne nachádzajú v pôde a na rozkladajúcich sa rastlinách. Touto skupinou mykóz najčastejšie trpia populácie žijúce v tropických a subtropických častiach sveta. Posledná skupina, systémové mykózy, sú najzávažnejším typom mykóz. Najčastejšie napádajú pľúca, ale môžu aj iné orgány. Sú častou príčinou morbiditu a mortality u imunokompromitovaných pacientov, pretože sa ťažko diagnostikujú a liečia len s obmedzeným počtom dostupných liekov. Účinná terapia je náročnou úlohou pri invazívnych infekciách, preto je väčšinou podávaná ako profylaxia [82].

Mikroorganizmy spôsobujúce infekcie môžeme rozdeliť do dvoch skupín: pravé patogény a oportunistické patogény, ktoré u inak zdravých jedincov nepredstavujú riziko.

Dermatofytóza je pojem používaný pre infekcie kože, nechtov a vlasov spôsobených skupinou húb. Medzi najčastejších pôvodcov patria *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Z približne 40 druhov, ktoré sú v súčasnosti identifikované, sa niektoré vyskytujú na celom svete, iné sú však obmedzené na konkrétne regióny. Najčastejším pôvodcom infekcie u ľudí je len približne 10 druhov [81]. Jednotlivé dermatofytózy získali pomenovanie podľa časti tela, kde infekcia prevláda. Rozlišujeme *Tinea capitis*, ktorá ovplyvňuje pokožku hlavy, spôsobuje vypadávanie vlasov. *Tinea barbae* postihuje dospelých mužov v oblasti brady. *Tinea faciei* sa vyskytuje na tvári vo forme svrbivých a odlupujúcich sa lézií. *Tinea corporis* napáda celé telo vo forme svrbivých oblastí s pľuzgierikmi. Ďalšími formami sú *Tinea inguinalis*, ktorá vytvára svrbivé lézie na trieslách a *Tinea pedis*, ktorá má vplyv na pokožku nôh – tvorí sa začervenanie a pocit svrbenia, na ktorú môže nadviazať *Tinea unguium*, kedy sú postihnuté okraje nechtov.

Kvasinky rodu *Candida* sú v organizme prítomné na koži, v hrubom čreve, v ústnej dutine a vagíne. V prípade ich premnoženia však môže dôjsť k infekcii. Príčinou bývajú rôzne ochorenia, napríklad diabetes, obezita, gravidita, ako aj užívanie antikoncepcie, antibiotík či kortikoidov. K infekcii prispieva aj teplota a zmena pH. Najčastejšou formou kandidózy je orálna kandidóza a Vulvovaginitis candidosa. Pri orálnej kandidóze trpí pacient bielymi povlakmi na jazyku a v hrdle. Po napadnutí pažeráka môže pacient pociťovať bolesti pri prehĺtaní spojené s možnosťou vykašliavania bielych povlakov. Pri diagnóze Vulvovaginitis

candidosa, znázornenej na obrázku č. 14, napáda *C. albicans* vulvu a vagínu. Spôsobuje svrbenie prechádzajúce do pálenia a belasý výtok.



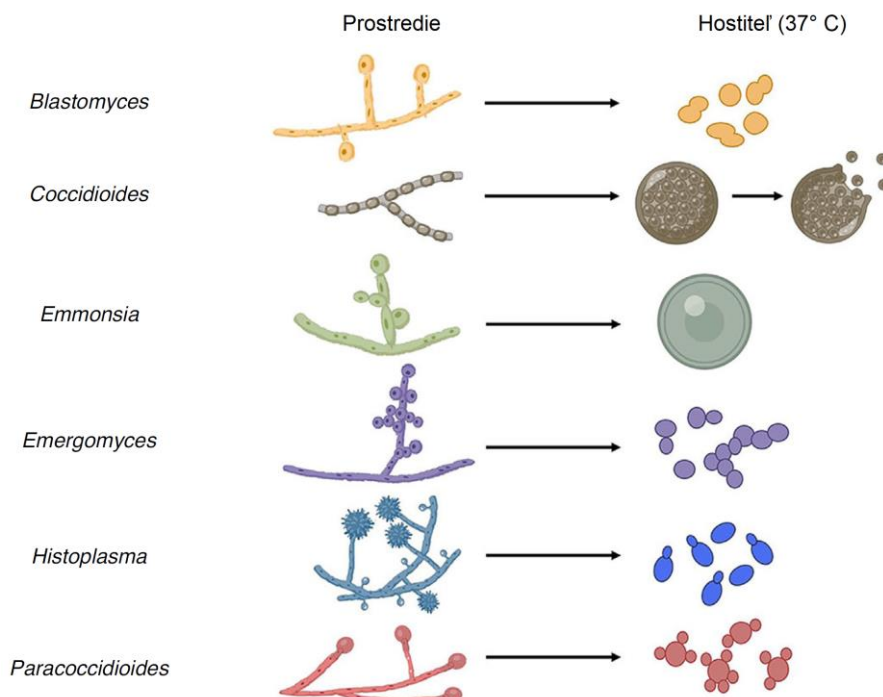
Obrázok 14: Vaginálna kvasinková infekcia [83]

Pôvodcom kokcidiomykózy je mikroorganizmus *Coccidioides immitis* alebo *C. posadasii*. Výskyt *Coccidioides* spp. je typický pre juhozápadné časti USA, Mexika a Latinskú Ameriku. Infekcia býva väčšinou asymptomatická avšak v niektorých prípadoch môže ohroziť život pacienta. Infekcia sa šíri inhaláciou, príznaky sú typické ako pri pneumónii či chrípke, pacient trpí horúčkami, bolesťami hlavy, kašľom atď. [84].

Kryptokokóza, infekcia spôsobená inhaláciou *Cryptococcus neoformans*, vplýva na pľúca, avšak v prípade imunokompromitovaných pacientov môže prejsť hematoencefalickou bariérou, infikovať mozog a spôsobiť meningitídu. Infekcia je rozšírená najmä v subsaharskej časti Afriky, kde sa odhaduje 200 000 nových prípadov ročne s úmrtnosťou viac ako 80 % [85].

Ďalšia infekcia napádajúca respiračný systém je histoplazmóza. Pôvodcom infekcie je *Histoplasma capsulatum* [86]. Nanešťastie táto infekcia býva často nesprávne diagnostikovaná ako multirezistentná tuberkulóza, čo vedie k početným úmrtiam. Infekcia napáda najmä pacientov s AIDS. V prípade tehotných žien boli potvrdené prípady transplacentárneho transferu infekcie [87].

Blastomykóza je infekcia spôsobená dimorfnou hubou *Blastomyces dermatitidis*. Infekcia je spôsobená vdýchnutím mikroorganizmov a vyskytuje sa najmä u dospelých mužov. Infekcia môže prepuknúť aj po transplantácii orgánov. Prejavmi sú kašľanie a horúčka. Infekcia je často zle diagnostikovaná, čo vedie k nevhodnému predpisu liekov, oneskoreniu vhodnej liečby a teda k progresu infekcie. U niektorých pacientov infekcia prerástla až do stavu ARDS – syndrómu akútnej respiračnej tiesne, čo viedlo k ich smrti [88].



Obrázok 15: Príklady patogénov - dimorfných húb, v myceliárnej a kvasinkovej forme (po vstupe do hostiteľa) [89]

2.8 Antifungálne látky

Spomínané fungálne infekcie bývajú veľkým problémom najmä v prípade imunokompromitovaných pacientov t.j. pacientov po transplantácii orgánov, pacientov trpiacich HIV, ľudí užívajúcich antibiotiká/antikoncepciu, pacientov liečiacich sa na rakovinu atď.

Problém pri vývoji nových antifungálnych látok a poskytovaní vhodnej terapie mykóz spočíva v podobnostiach medzi cieľovou bunkou kvasinky a hostiteľskou bunkou cicavca, ktoré sú eukaryotické a pracujú podobným spôsobom. Pri liečbe sa uplatňuje zásada selektívnej toxicity, kedy je cieľom antifungálnych látok infekčný mikroorganizmus a nie bunky hostiteľa. „Ideálna“ fungicídna látka by mala byť účinná pri nízkych dávkach, mala by byť orálne absorbovaná, dobre distribuovaná, metabolicky stabilná, rozpustná vo vode a bez možnosti rezistencie [90].

Jednotlivé antifungálne látky majú rôzne mechanizmy účinku. Prvým z nich je inhibícia DNA, RNA a syntézy proteínov. Druhým mechanizmom účinku je vytvorenie komplexu s DNA, čo má za následok inhibíciu syntézy RNA. Ďalší predstavuje permeabilizáciu membrán. Štvrtý mechanizmus je založený na inhibícii syntézy bunkovej steny alebo enzýmových aktivít. Piaty zahŕňa vyvolanie apoptózy. Posledným možným účinkom je represia skladania proteínov a metabolického obratu, ktorý pozostáva z dvoch protichodných dejov, syntézy bielkovín z voľných aminokyselín a degradácie bielkovín na aminokyseliny. Podľa

pôvodu je možné rozdeliť antifungálne látky na prírodné a syntetické. Antifungálne látky sa delia do piatich skupín: analógy fluórovaných pyrimidínov, azoly, polyény, allylamíny a echinokandíny [91].

Najznámejším zástupcom analógov fluórovaných pyrimidínov je fluorocytosín, ktorý inhibuje syntézu DNA alebo RNA kvasiniek. Po absorpcii fluorocytosínu (5-FC) do kvasinkovej bunky a premene na 5-fluorouracil (5-FU) je možné rozlíšiť dva mechanizmy. Prvý mechanizmus spočíva v konverzii 5-fluorouracilu na 5-fluoruridínmonofosfát (FUMP) a 5-fluoruridíndifosfát (FUDP) na 5-fluoruridíntrifosfát (FUTP). FUTP sa inkorporuje do kvasinkovej RNA namiesto uridylovej kyseliny, čo mení aminoacyláciu tRNA, naruší zásobu aminokyselín a nakoniec inhibuje syntézu proteínov. Druhým mechanizmom je premena 5-fluorouracilu na 5-fluorodeoxyuridínmonofosfát (FdUMP) pomocou uridínmonofosfátpyrofosforylázy. FdUMP predstavuje silný inhibítor tymidylátsyntetázy, ktorá je kľúčovým enzýmom v biosyntéze DNA [92].

Medzi najznámejšie azoly patria flukonazol, vorikonazol, posakonazol. Na integritu membrány má vplyv ergosterol. Integrita membrány však vyžaduje steroly, ktoré neobsahujú C4 metylové skupiny. Cieľom azolov je proteín, ktorý katalyzuje demetyláciu závislú od cytochrómu P-450 lanosterolu. Inhibícia 14 α -demetylázy vedie k vyčerpaniu ergosterolu a akumulácii sterolových prekursorov vrátane 14 α -metylovaných sterolov a 24-metyléndihydrolanosterolu, čo má za následok vznik štruktúrne pozmenenej plazmatickej membrány [93].

Zástupcami polyénov sú nystatín, amfotericín B, natamycín. Polyénové antifungálne látky sa viažu na steroly a vytvárajú komplexy, ktoré spôsobujú zmeny v membráne buniek. Polyény vytvoria kanáliky v membráne, čo má za následok stratu permeability. Na afinitu k rôznym sterolom má vplyv počet konjugovaných väzieb a molekulová hmotnosť daného polyénu [94].

Mechanizmom účinku allylamínov je inhibícia enzýmu skvalén epoxidáza, ktorá potom bráni biosyntéze ergosterolu v membráne [95]. Najznámejšími zástupcami allylamínov je naftifín alebo terbinafín.

Echinokandíny sú najnovším prírastkom do antifungálnych látok. V súčasnosti sa využívajú tri látky, mikafungín, kaspofungín a anidulafungín. Echinokandíny blokujú syntézu bunkovej steny inhibíciou β -(1,3)-D-glukán syntázy, t.j. syntetizuje sa menšie množstvo β -(1,3)-D-glukánu, čo má za následok zhoršenie integrity bunky až jej lýzu. Tieto látky sa často využívajú proti *Candida* spp. alebo *Aspergillus* spp [96].

2.8.1 Inhibítory TargetMol

V rámci tejto diplomovej práce bol skúmaný účinok 67 komerčne dostupných inhibítorov z knižnice TargetMol. Štrukturálne vzorce inhibítorov sú znázornené v Prílohe 1 (P1).

Hexetidín (P1, Obr. 1a) je syntetický hexahydropyridín, ktorý má antimikrobiálny a antifungálny účinok in vitro aj in vivo. Je aktívny proti grampozitívnym aj gramnegatívnym

mikroorganizmom [97]. Keďže je účinný aj voči mikroorganizmom v ústnej dutine, je využívaný ako zložka ústnych vôd.

Berberín hydrochlorid (P1, Obr. 1b), je izochinolínový alkaloid izolovaný z rôznych čínskych bylín, napríklad *Phellodendron amurense*. Má rôzne účinky medzi ktoré patrí antidiabetický účinok, antiaterosklerotický účinok, pôsobí neuroprotektívne, zlepšuje syndróm polycystických vaječníkov a navyše má aj antifungálny účinok [98].

Hydroxychinolín (P1, Obr. 2a) predstavuje látku so širokým okruhom farmakologických účinkov. Je výborný neuroprotektant, funguje ako protirakovinové činidlo a ako činidlo proti HIV, má antifungálny účinok, pôsobí aj proti *Mycobacterium tuberculosis* [99].

Dichlorofén (P1, Obr. 2b), bezfarebný kryštál bez zápachu sa využíva ako fungicíd a baktericíd. Je vhodný na ochranu textílií a iných materiálov proti plesniam a riasam. Využitie našiel aj ako liečba proti parazitom u zvierat [100].

Vagistat (P1, Obr. 3a) je látka vo forme 6,5 % tiokonazolu. Tiokonazol je liečivo pochádzajúce zo Spojeného kráľovstva a v súčasnosti je dostupné na liečbu vo Veľkej Británii a Európe. Je často využívané na liečbu onychomykózy [101].

Amorolfín hydrochlorid (P1, Obr. 3b), má antifungálny účinok. Štúdie in vitro preukázali antifungálny účinok proti *C. albicans* a *Cryptococcus neoformans*. Antimykotická aktivita in vitro je variabilná a závisí od typu kmeňa a teploty inkubácie [102].

Sulbentín (P1, Obr. 4a) má širokospektrálny účinok a používa sa hlavne pri liečbe dermatomykóz.

Mikonazol (P1, Obr. 4b), je antimykotikum, ktoré patrí do skupiny derivátov imidazolu. Látka pôsobí inhibične na biosyntézu ergosterolu, čo má za následok zmenu permeability a funkčnosti membrány [103].

Kryštalická violet' (P1, Obr. 5a) známa aj ako genciánová fialová je farbivo s antibakteriálnym, antifungálnym, a protinádorovým účinkom. Kryštalická violet' je používaná už od roku 1861 a zvyčajne sa využíva ako doplnok k liečbe mnohých chorôb, napr. MRSA (metecilín-rezistentný *Staphylococcus aureus*) alebo pri infekciách spôsobených *Candida* spp. [104].

Pyritión zinku (P1, Obr. 5b), je antimikrobiálna látka, ktorá sa najčastejšie používa v šampónoch proti lupinám. Predpokladá sa, že účinkuje prostredníctvom zvýšenia hladiny medi v bunke [105].

Klotrimazol (P1, Obr. 6a) je syntetická zlúčenina predstavujúca širokospektrálne antimykotikum, ktoré sa používa hlavne na liečbu mykóz spôsobených *C. albicans*. Predáva sa ako aktívna zložka rôznych liekov pod rôznymi obchodnými názvami viacerých spoločností. Taktiež sa využíva pri liečení trichomoniázy rezistentnej na metronidazol [106].

Tiomersal (P1, Obr. 6b), zlúčenina, ktorej skoro 50 % hmotnosti tvorí ortuť, vykazuje bakteriostatické a fungistatické účinky. V minulosti bol využívaný aj ako konzervačná látka vo vakcínach.

Mikonazol nitrát (P1, Obr. 7a) je využívaný na lokálnu liečbu dermatofytóz, *Tinea versicolor* a kožnej a genitálnej kandidózy [107].

Syntéza chloridu dequalínia (P1, Obr. 7b) pochádza z päťdesiatych rokov minulého storočia. Zlúčenina je využívaná ako povrchovo aktívna, antibakteriálna a antifungálna látka vo farmaceutických výrobkoch a taktiež v kozmetike na ústnu hygienu [108].

Účinok fluorocytosínu (P1, Obr. 8a) je popísaný v kapitole 2.7 Antifungálne látky.

Itrakonazol (P1, Obr. 8b), je látka, ktorá účinkuje širokospektrálne. Ide o triazolovú zlúčeninu, ktorá sa používa na liečbu blastomykózy, onychomykózy a histoplazmózy. Je vhodný aj ako liečivo proti aspergilóze, ktorá je rezistentná voči amfotericínu B [109]. Taktiež je účinný proti infekciám *Candida albicans* u HIV pozitívnych pacientov, ktorí nereagujú na flukonazol [110].

Amfotericín B (P1, Obr. 9a) sa aj napriek jeho toxicite a vývoji iných antifungálnych látok používa na liečbu plesňových infekcií. Táto látka ostáva stále prvou voľbou pri liečbe život ohrožujúcich infekcií, napr. kryptokokovej meningitídy alebo zygomykózy. Amfotericín B je taktiež účinný voči kandidóze, histoplazmóze, sporotrichóze atď. [111].

Tolnaftát (P1, Obr. 9b) je ďalšou z antifungálnych zlúčenín. Pôsobí proti hubám *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* a kvasinkám *Malassezia*. Mechanizmus jeho účinku pozostáva z inhibície skvalén epoxidázy [112].

Ciklopirox etanolamín (P1, Obr. 10a) je derivátom hydroxypyridónu. Ide o syntetickú zlúčeninu, ktorá má široké spektrum účinku. Účinkuje prostredníctvom chelatacie trojmocných kovových kationov. Polyvalentné kationy pôsobia inhibične na enzýmy napr. na cytochrómy, ktoré zohrávajú úlohu v mitochondriálnom transporte elektrónov [113].

Látka imazalil (P1, Obr. 10b), je chirálny fungicíd, ktorý je často využívaný pri pestovaní zeleniny a ovocia. Antifungálna aktivita tejto látky je závislá od pH, je účinný pri pH cca 5, avšak pri pH 7 už nie [114] [115].

Oxikonazol nitrát (P1, Obr. 11a) je širokospektrálna imidazolová zlúčenina, ktorej mechanizmus spočíva v inhibícii syntézy DNA a znížení koncentrácie ATP. Nevýhodou tejto zlúčeniny je jej nižšia rozpustnosť [116].

Triklosan (P1, Obr. 11b) je jednou z antimikrobiálnych látok, ktorá sa pôvodne používala v nemocniciach, v zdravotníckych pomôckach, napr. v ureterálnych stentoch alebo chirurgických švoch. Neskôr sa stala súčasťou rôznorodých hygienických výrobkov pre spotrebiteľov. Svoje uplatnenie našla v mydlách, prípravkoch k ústnej hygiene, dezinfekčných prostriedkoch [117].

2,3-dichlóranizol (P1, Obr. 12a) je vo farmaceutickom priemysle medziproduktom syntézy kyseliny močovej.

Bifonazol (P1, Obr. 12b), je substituované imidazolové činidlo, ktoré má široké spektrum účinnosti najmä voči dermatofytom, kvasinkám, plesniam a niektorým grampozitívnym baktériam. Je účinný už v 1 % koncentrácii vo forme gélov, krémov, roztokov pri liečbe

plesňových infekcií kože. Jeho účinok je podobný mikonazolu, klotrimazolu a oxikonazolu [118].

Butenafin hydrochlorid (P1, Obr. 13a) patrí do skupiny benzylamínových derivátov. Je dobre rozpustný v etanole a metanole, alebo iba mierne rozpustný vo vode. Jeho protiplesňová aktivita je širokospektrálna a účinná najmä proti *Aspergillus* a dermatofytom. Jeho mechanizmom pôsobenia je inhibícia syntézy sterolov vďaka blokácii epoxidácie skvalénu [119].

Sklareolid (P1, Obr. 13b) je prírodný produkt, ktorý je izolovaný z rôznych druhov rastlín a vykazuje fytotoxický, cytotoxický a antimykotický účinok. Využíva sa aj ako východiskový materiál pre syntézu bioaktívnych produktov [120].

Kyselina gibberelová (P1, Obr. 14a), tetracyklická terpenoidná zlúčenina, predstavuje rastlinný hormón ovplyvňujúci rast a vývoj rastlín [121].

Pirokton olamín (P1, Obr. 14b) je antifungálna zlúčenina, ktorá bola prvýkrát syntetizovaná v roku 1979 spoločnosťou Schwarzkopf-Henkel. Je zložkou rôznych kozmetických výrobkov, napr. šampónov proti lupinám, ktoré sú spôsobené kolonizáciou pokožky hlavy mikroorganizmom *Malassezia* spp. [122].

Pimaricín (P1, Obr. 15a), nazývaný aj natamycín, je jedným z polyénových činidiel. Je produkovaný mikroorganizmom *Streptomyces natalensis* a používa sa proti fungálnym infekciám. Je často využívaný aj v potravinárskom priemysle na prevenciu proti kontaminácii konzervovaného mäsa a syrov. Mechanizmus jeho účinku stále nie je známy [123].

Ketokonazol (P1, Obr. 15b) je derivát imidazolu využívaný pre svoju antinfugálnu aktivitu. V minulosti sa preukázalo, že ketokonazol má účinok na syntézu steroidov u ľudí prostredníctvom inhibície cytochrómu P450 a znížením hladiny kortizolu [124].

Pravastatín sodný (P1, Obr. 16a) je zlúčenina, ktorá inhibuje biosyntézu cholesterolu. Pôsobí inhibične voči HMG-CoA-reduktáze, ktorá je kľúčovým enzýmom pri syntéze cholesterolu.

Octan fenylortuťnatý (P1, Obr. 16b), je využívaný ako dezinfekčný prostriedok a fungicíd. Za jeho účinok je zodpovedná hlavne ortuť, voči ktorej však môžu byť rezistentné niektoré mikroorganizmy, napr. *Penicillium roqueforti*. *Staphylococcus aureus*, je naň rezistentný je v prítomnosti *Escherichia coli*, keďže *E. coli* absorbuje octan fenylortuťnatý a premieňa ho na prchavé deriváty ortuti [125]. Octan fenylortuťnatý býva potom lokalizovaný na bakteriálnom povrchu rezistentných baktérií.

Salicylanilid (P1, Obr. 17a) vykazuje širokospektrálny účinok voči hubám, baktériám, prvokom a vírusom. Má viacnásobný účinok, jedným z nich je inhibícia rastu mikroorganizmu prostredníctvom depolarizácie jeho membrány [126].

Undecylenát zinočnatý (P1, Obr. 17b), vzniká kombináciou kyseliny undecylénovej a undecylátu zinočnatého. Látka musí obsahovať najmenej 10 % undecylenátu aby bola zabezpečená jej účinnosť. Undecylenát zinočnatý zmierňuje podráždenie a je adstringentný [127].

Kliochinol (P1, Obr. 18a) sa vyrába už od roku 1934. Bol využívaný na liečbu širokého spektra črevných ochorení, napr. šigelózy (dyzentérie), chronickej hnačky atď. Na začiatku 70. rokov bol stiahnutý z trhu kvôli spojeniu so subakútnou myelooptickou neuropatiou [128]. V dnešnej dobe je využívaný ako antimikrobiálne činidlo a študuje sa jeho potenciál na liečenie Alzheimerovej choroby [129].

Chloroxylenol (P1, Obr. 18b) je látka s dlhoročnou históriou používania v antiseptických výrobkoch a pesticídoch. V minulosti bola študovaná jeho toxicita v antiseptických výrobkoch, ktorá sa však nepotvrdila [130].

Chlorobutanol (P1, Obr. 19a) je využívaný ako konzervačná látka v kozmetických a farmaceutických produktoch, napr. v masťach alebo injekciách. Má antibakteriálne a antifungálne vlastnosti a zvyčajne sa využíva na zabezpečenie stability produktov v koncentrácii 0,5 % [131].

Kyselina salicylová alebo kyselina 2-hydroxybenzoová (P1, Obr. 19b) je izolovaná zo stromov, napr. brezy, vrb, prípadne sa pripravuje synteticky. Patrí medzi β -hydroxykyseliny a narozdiel od α -hydroxykyselín je rozpustná v tukoch, teda aj v epidermálnych lipidoch. Práve z tohto dôvodu je často využívaná v kozmetike, najmä v kozmetike pre ľudí s akné [132].

Magnolol (P1, Obr. 20a), hydroxylovaný bifenyľ, je látka izolovaná z koreňa a stonky magnólie. Magnolol vykazuje viacero aktivít, ako napríklad antioxidačná aktivita a protizápalová aktivita, alebo antiaterosklerotický a antimikrobiálny účinok. Mnoho štúdií dokázalo, že magnolol je možné uplatniť aj pri liečbe rakoviny prsníka, pľúc, prostaty atď. Indukuje apoptózu, znižuje proliferáciu buniek a bunkovú cytotoxicitu [133].

Chlórchinaldín (P1, Obr. 20b), je derivát 8-hydroxychinolínu a využíva sa samostatne na liečbu infekcií kože alebo v kombinácii s inými liečivami. Chlórchinaldín je účinný voči širokému spektru húb a aj voči niektorým druhom baktérií [134].

Spektinomycín dihydrochlorid (P1, Obr. 21a) je antibiotikum, ktoré je produkované *Spreptomyces spectabilis*. Využíva sa proti gramnegatívnym baktériám a na liečbu kvapavky.

Tiabendazol (P1, Obr. 21b) je látka s benzimidazolovou skupinou. Ide o biely prášok s nižšou rozpustnosťou vo vode. V minulosti sa využíval na liečbu proti škvravke a ako fungicíd pre zeleninu a ovocie. Využitie našiel aj pri liečbe otravy kovmi, keďže pôsobí chelatačne [135].

Trometamol (P1, Obr. 22a) sa používa pri syntéze povrchovo aktívnych látok, ako urýchľovač vulkanizácie, emulgátor a ako liečivo pri ochoreniach obličiek, napr. pri chemolýze obličkových kameňov [136].

Flukonazol (P1, Obr. 22b), je novšie triazolové antimykotikum, ktoré sa využíva najmä na liečbu oportúnnych mykóz u pacientov, ktorí majú oslabenú imunitu, napríklad u pacientov s AIDS. V porovnaní s inými antimykotikami má flukonazol veľmi dobré fyzikálne a farmakokinetické vlastnosti ako je jeho rozpustnosť vo vode, dobrá biologická dostupnosť orálnou cestou, vynikajúca distribúcia v tkanivách a v nervovom systéme. Pôsobí proti *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* a dermatofytom [137].

Klimbazol (P1, Obr. 23a) patrí medzi imidazolové fungicídne činidlo, ktoré sa využíva najmä v prípravkoch proti lupinám. Pôsobí inhibične na syntézu ergosterolu [138].

Terbinafín hydrochlorid (P1, Obr. 23b) je derivátom alylamínu. Účinkom terbinafinu hydrochloridu je inhibícia syntézy ergosterolu. Inhibuje rast bunkových stien kvasiniek, čo vedie k smrti bunky. Využíva sa pri liečbe kože pri výskyte dermatofytóz a onychomykóze [139].

Mechlóretamín hydrochlorid (P1, Obr. 24a) sa využíva na liečbu Hodgkingovej choroby a lymfosarkómu. Inhibuje bunkové enzýmové systémy, čo vedie k bunkovej smrti [140].

Butokonazol nitrát (P1, Obr. 24b) je derivát imidazolu, ktorý má fungicídny účinok voči *Candida* spp. Je účinný voči vaginálnym infekciám spôsobených *C. albicans*. Bola preukázaná aj aktivita voči *S. cerevisiae*. Všeobecným účinkom butokonazolu je inhibícia konverzie lanosterolu na ergosterol a teda zmena lipidovej časti bunkových membrán [141].

Ciklopirox (P1, Obr. 25a) je antimykotikum používané v rôznych formách, napr. krém, gél, roztok, prášok, lak. Ciklopirox sa mechanicky líši od iných antimykotík. Jeho účinok sa pripisuje hydroxy skupine, keďže jej elimináciou dochádza k strate antimykotického účinku [142].

Nifuratel (P1, Obr. 25b) je nitrofuránový derivát, ktorý je aktívny proti *Trichomonas vaginalis* a aj proti širokému spektru baktérii [143].

Naftifín hydrochlorid (P1, Obr. 26a) je činidlo zo skupiny alylamínov, ktoré má fungicídnu a fungistatickú aktivitu. Používa sa na liečbu dermatofytóz dolných končatín, ktorá sa nazýva aj „atletická noha“ (*Tinea pedis*).

Nystatín (P1, Obr. 26b) patrí medzi polyénové antibiotiká získané zo *Streptomyces noursei*. Je účinný voči širokému spektru mikroorganizmov, najmä voči *C. albicans*, *A. fumigatus* a *Histoplasma capsulatum*. Z dôvodu zlej absorpcie sa využíva najmä lokálne proti kožnej kandidóze [144].

Lulikonazol (P1, Obr. 27a) je imidazolové fungicídne činidlo. Štúdie lulikonazolu ukázali jeho vynikajúcu aktivitu proti dermatofytom a štúdie in vitro a in vivo ukázali aktivitu aj voči *C. albicans*, *A. fumigatus* a *Malassezia* spp. Lulikonazol má aktivitu aj voči *Trichophyton* spp [145].

Pentamidín izotionát (P1, Obr. 27b) je antiprotozoálne činidlo využívané najmä na prevenciu a liečbu pneumónie spôsobenej *Pneumocystis carinii*, oportúnnej infekcie, najmä u imunokompromitovaných pacientov (pacientov s HIV) [146].

Isavukonazol (P1, Obr. 28a), triazol druhej generácie, má širokospektrálny účinok a dobrý farmakokinetický profil. Jeho ďalšou výhodou je, že málo interaguje s inými liekmi. Využíva sa na liečbu aspergilózy. Mechanizmus účinku isavukonazolu je inhibícia biosyntézy ergosterolu [147].

Efinakonazol (P1, Obr. 28b), látka patriaca do skupiny azolov, má výborne antifungálne účinky voči dermatofytom. Účinok je porovnateľný s terbinafinom a v prípade *Candida* spp. je

jeho účinok lepší ako účinok itrakonazolu, amorolfínu, ciklopiroxu [148]. V dnešnej dobe sa predáva na liečbu nechtovej mykózy.

Karbendazím (P1, Obr. 29a) sa používa ako fungicíd v lesníctve, poľnohospodárstve a vo veterinárnych liekoch. Jeho nevýhodou je, že znečisťuje pôdu a vodu a má toxické účinky na ľudí, vodný život a pôdne mikroorganizmy [149].

Myklobutanil (P1, Obr. 29b), je triazolový fungicíd, ktorý sa využíva v postrekoch proti mikroskopickým hubám *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes* na hrozne, zelenine, ovocí a obilninách. Myklobutanil nie je metabolizovaný ľudskými enzýmami [150].

Ekonazol nitrát (P1, Obr. 30a) je fungicídne, imidazolové činidlo, ktoré vykazuje účinnosť voči *C. albicans*. Používa sa lokálne na kožu, prípadne vaginálne [151].

Mezylát dihydrátu pefloxacínu (PMD; P1, Obr. 30b), fluórovaný chinolón, je antibakteriálna látka, ktorá sa využíva voči grampozitívnym aj gramnegatívnym baktériám, ktoré bývajú rezistentné na iné antibakteriálne činidlá [152].

Kasugamycín hydrochlorid (P1, Obr. 31a) je produkovaný *Streptomyces kasugaensis* a má preventívny účinok proti napadnutiu ryže mikroorganizmom *Piricularia oryzae*. V humánnej a veterinárnej medicíne sa nevyužíva.

Vorikonazol (P1, Obr. 31b) je triazolový derivát druhej generácie a má širokospektrálny účinok. U dospelých je využívaný najmä na liečbu aspergilózy a kandidózy u pacientov bez neutropénie, t.j. bez poklesu neutrofilov [153].

Hygromycín B (P1, Obr. 32a) je aminoglykozidové antibiotikum, ktoré je produkované *Streptomyces hygroscopicus* a je rozšírené najmä vo veterinárnej oblasti. Je štrukturálne podobný neomycínu, gentamicínu a paromomycínu [154].

Mikafungín sodný (P1, Obr. 32b) patrí medzi lipopeptidové látky z triedy echinokandínov. Účinkuje proti *C. albicans* a *A. fumigatus* vďaka inhibícii syntézy β -(1,3)-glukánu. Účinnosť je podobná s amfotericínom B, ale je vyššia ako účinnosť flukonazolu a itrokonazolu [155].

Liranaftát (P1, Obr. 33a) pôsobí inhibične na skvalén-epoxidázu, čím zvyšuje permeabilitu membrány. Využíva sa ako liek proti dermatofytom [156].

Kasprofungín (P1, Obr. 33b) patrí do triedy echinokandínov a podobne ako mikafungín sodný, inhibuje syntézu β -(1,3)-glukánu. Využitie našiel pri liečbe infekcií, ktoré sú spôsobené *Candida* spp. alebo *Aspergillus* spp. Je vhodnou alternatívou k amfotericínu B alebo flukonazolu [157].

Antimycín A (P1, Obr. 34a) je antibiotický komplex, ktorý je zložený z najmenej štyroch komponentov príbuznej štruktúry. Látky tejto skupiny sú produkované viacerými druhmi baktérií *Streptomyces*. Tieto zlúčeniny sú schopné inhibovať aeróbne dýchanie húb [158].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bola príprava a čiastočná purifikácia transglykozyláz bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (Crh2) a *Candida albicans* (Phr1 a Phr2) expripovaných kmeňmi *Pichia pastoris*. Ďalším cieľom bola príprava fluorescenčne značeného laminarioligosacharidu ako akceptorového substrátu transglykozylačnej reakcie týchto enzýmov. Pripravené Phr enzýmy slúžili na testovanie inhibičného účinku 67 látok, ktoré sú súčasťou komerčnej knižnice inhibítorov TargetMol a na stanovenie spôsobu ich účinku na vysokomolekulárny substrát. V prípade enzýmu Crh2 bola stanovená afinita enzýmu k akceptorom s rôznym stupňom polymerizácie.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Zoznam použitých chemikálií

Bruker, Nemecko: Peptide Calibration Standard II

Jena Bioscience, Nemecko: Ni-NTA agaróza

Lachema, Česká republika: octan amónny ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), orcinol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$), tetraboritan disodný ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

Megazyme, Írsko: laminarioligosacharidy (LaO4-LaO6), chitoligosacharid (CH5)

Merc Milipore, Nemecko: acetonitril (CH_3CN), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), chlorid sodný (NaCl), metanol (CH_3OH), kyselina mravčia (HCOOH), kyselina trifluóroctová (TFA), Nesslerove činidlo, Silica gél 60

Promega, USA: trypsín

Sigma – Aldrich, USA: 2-amino-2-hydroxymetyl-propán-1,3-diol (Tris, $((\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2)$), akrylamid/bisakrylamid, biotín, CM-chitín, *threo*-1,4-dimercapto-2,3-butanediol (ditiotreitol, DTT), glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), glycín ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), histidín, kvasinkový extrakt práškový, kvasinková dusíkatá báza, kyanoborohydrid sodný (NaCNBH_3), kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$), kyselina dihydroxybenzoová (DHB, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$), peptón

Slavus, Slovensko: acetón (CH_3COCH_3), bróm-fenolová modrá ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), hydrogénfosforečnan disodný (Na_2HPO_4), persíran amónny ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

TargetMol, USA: inhibítory

Thermo Scientific, USA: N,N,N',N'-tetrametyletán-1,2-diamín ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, TEMED), proteínový štandard na SDS-PAGE 0 - 170kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), sodium dodecyl sulfát (SDS), Page-Blue™ Protein Staining Solution

Použité chemikálie boli všetky o čistote p.a.

4.2 Zoznam použitých prístrojov

Centrifúga Allegra™ X-22R, Beckman Coulter, USA

Centrifúga MiniSpin, Eppendorf, Nemecko

Elektroforetická aparatúra Criterion Electrophoresis System, Bio-rad, USA

Fluorometer QUBIT™ Fluorometer, Invitrogen, USA

HPLC Dionex Ultimate 3000 s fluorescenčným detektorom, ThermoScientific, USA s kolónou TSK-GEL G3000 SWXL 7,8 mm x 300 mm, TosoHaas, Japonsko

Inkubátor Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, Biosan, Litva

MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme, Bruker, Nemecko

MTP AnchorChip 384, Bruker Daltonics, Nemecko

MTP Polished Steel 384, Bruker Daltonics, Nemecko

Spektrofotometer DU730, Beckman-Coulter, USA

Spektrofotometer Mithras² LB943 Multimode Reader, Berthold Technologies, Nemecko

Termostat Biological Thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Termoblok Eppendorf Thermomixer C, Eppendorf, Nemecko

Trepačka Polymax 1040, Heidolph, Nemecko

UV transiluminátor, Fotodyne Incorporated, USA

Váhy ABT 120-4M, KERN&Sohn GmbH, Nemecko

Vákuová odparka Concentrator Plus, Eppendorf, Nemecko

Vákuová rotačná odparka Hei-VAC Precision, Heidolph, Nemecko

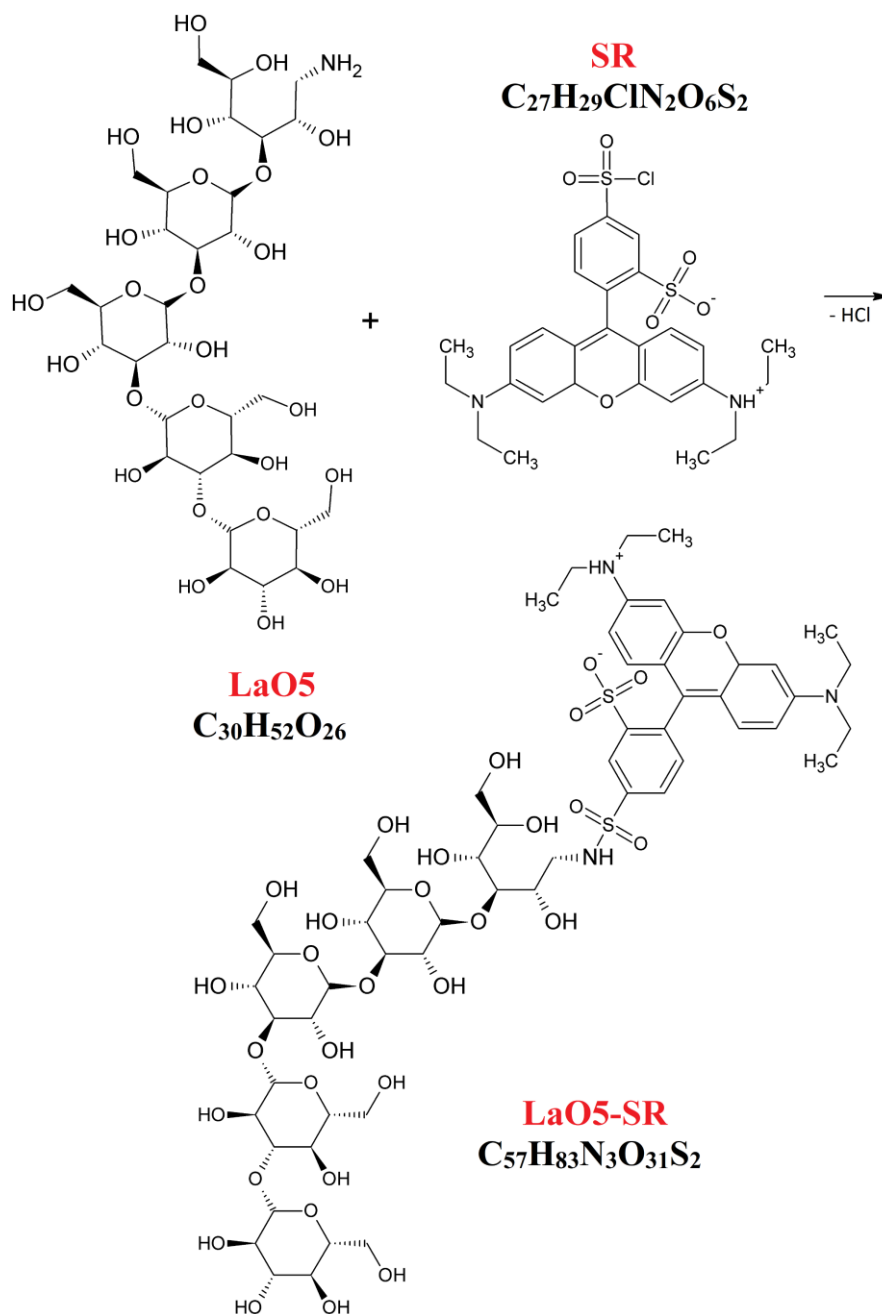
Vortex Mini-Bioshaker 3D, Biosan, Litva

Vortex Polymax 1040, Heidolph, Nemecko 49

Zdroj pre elektroforézu PowerPac Universal Power Supply, Bio-Rad, USA

4.3 Fluorescenčné značenie oligosacharidov

Zavedenie sulforodamínu (SR) ako fluorescenčnej značky do oligosacharidu sa dá rozdeliť do niekoľkých krokov: aminácia oligosacharidu, samotné zavedenie fluorescenčnej značky a prečistenie produktu [159]. Reakcia aminovaného pentalaminarioligosacharidu (LaO5) so SR je znázornená na obrázku č. 16.



Obrázok 16: Reakcia aminovaného pentalaminarioligosacharidu (LaO5) so sulforodaminom (SR) za vzniku LaO5-SR a HCl

Po navážení všetkých zložiek, t.j. 5 mg LaO₅ (Megazyme), 5 mg NaCNBH₃ (Sigma) a 30 mg octanu amónneho, ktoré sa rozpustili v 100 µl redestilovanej vody, sa zmes inkubovala 4 hod. pri 80 °C. Po skončení inkubácie bol odobraný 1 µl zmesi a nariadený 10x vodou. 1 µl nariadenej zmesi bol nanosený na silikagélovú platničku Silica gel 60 (Merck). Ako štandard bol použitý 1 µl LaO₅. Platnička sa nechala vyvíjať v systéme propranol-metanol-voda (2:1:1). Pre vizualizáciu glykamínov bol na platničku po vybratí z vyvíjacej zmesi a usušení aplikovaný orcinol. Po aplikácii orcinolu bola platnička zahriata nad varičom. Glykoamíny ostali na štarte platničky, zatiaľ čo nezreagované oligosacharidy boli vynesené ďalej od štartu. K reakčnej zmesi boli pridané 3 ml etanolu a zmes sa nechala stáť 16 hod. pri 4 °C. Vytvorená zrazenina bola centrifugovaná pri 4500 ot. 5 min. a premývaná 90 % etanolom až do odstránenia amónnych iónov, ktorých prítomnosť sa kontrolovala reakciou s Nesslerovým činidlom. Prítomnosť amónnych iónov sa stanovila na filtračnom papieri.

4.3.2 Zavedenie fluorescenčnej značky do glykamínu LaO₅

Zrazenina z predchádzajúceho kroku bola rozpustená v 0,5 ml 3 % tetraboritanu sodného, následne bolo k zmesi pridaných 5 mg SR (Sigma). Zmes sa nechala inkubovať za tmy 16 hod. pri laboratórnej teplote. Po inkubácii sa k zmesi pridalo 5 ml acetónu a vzniknutá zrazenina sa oddelila od supernatantu centrifugáciou (4500 ot., 5 min., 4 °C). Tento proces sa opakoval až kým nebol supernatant bezfarebný.

Po premytí acetónom sa k zrazenine pridalo 5 ml ľadového 70 % etanolu. Zmes sa nechala stáť po dobu 30 min. pri laboratórnej teplote, následne sa sцентриfugovala (4500 ot., 5 min., 4 °C). Po skončení centrifugácie bol supernatant zliaty do kadičky. Proces sa opakoval 5-krát. Spojené supernatanty boli zahustené na odparke. Odparok sa rozpustil v 2 ml 20 % etanolu. Ďalším krokom bolo spektrofotometrické stanovenie koncentrácie produktu. Použila sa vlnová dĺžka 566 nm, vzorka bola zriedená 100 x 20 % etanolom, meralo sa proti 20 % etanolu. Koncentrácia produktu bola vypočítaná podľa vzťahu:

$$c = \frac{A_{566}}{\varepsilon \cdot l} \cdot \text{riedenie} \quad (1)$$

kde ε predstavuje extinkčný molárny koeficient SR a l predstavuje priemer kyvety.

Po spektrofotometrickom stanovení sa robila predbežná kontrola čistoty produktov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC). Na platničku bol nanosený 1 µl vzorky, štandard bol 1 µl roztoku SR. Platnička sa nechala vyvíjať v zmesi butanol-etanol-voda (5:3:2). Po skončení vyvíjania bola platnička vysušená a čistota fluorescenčného produktu skontrolovaná pod UV svetlom. Vzhľadom na to, že produkt bol ešte silne znečistený nezreagovaným SR, použila sa na ďalšie prečistenie kvapalinová chromatografia na silikagéle 60 (Merck).

4.3.3 Prečistenie fluorescenčne značeného produktu

Prázdna 5 ml plastová injekčná striekačka bola vystlaná filtračným papierom a naplnená 3 ml silikagélom. Kolónka bola utrasená a na suchý silikagél bol nanesený produkt získaný v predošlom kroku. Kolónka bola následne premývaná acetónom, až kým eluát nebol bezfarebný. Produkt bol potom vytesnený 20 % etanolom a eluát zahustený na odparke. Kontrola čistoty bola opäť realizovaná TLC za rovnakých podmienok ako v predošlom kroku. Na záver sa stanovila koncentrácia získaného produktu, ktorá bola opäť vypočítaná podľa vzťahu 1.

4.3.4 Stanovenie LaO5 a LaO5-SR pomocou hmotnostnej spektrometrie

Identifikácia a kontrola čistoty LaO5 (Megazyme) a LaO5-SR po zavedení fluorescenčnej značky sa realizovala MALDI-TOF analýzou. Obe vzorky (1 μ l) boli nanášané na MALDI platničku MTP 384 Polished Steel (Bruker) a po uschnutí prekryté DHB (kyselina dihydroxybenzoová, 5 mg/ml v 50 % ACN) matricou. Prístroj bol kalibrovaný na Peptide Calibration Standard II (Bruker). Vzorky boli následne analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie na zariadení MALDI-TOF/TOF MS UltrafleXtreme (Bruker). MALDI TOF MS meranie bolo robené v reflektónovom pozitívnom móde.

4.4 Indukcia enzýmov

4.4.1 Kmene *Pichia pastoris* pre expresiu rekombinantných kvasinkových transglykozyláz

Kmene *P. pastoris* pre expresiu rekombinantných proteínov Phr1 a Phr2 boli pripravené v laboratóriu prof. Laury Popolo, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Bioscienze, Taliansko [77] a pre expresiu enzýmov Crh1 a Crh2 v laboratóriu prof. Javiera Arroyo, Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Španielsko [160].

4.4.2 Expresia, izolácia a purifikácia enzýmov Phr1 a Phr2

Kmene *P. pastoris* pre expresiu proteínov Phr1 a Phr2 boli kultivované v komplexnom glycerolovom médiu MGY (1 % kvasinkový extrakt, 2 % peptón, 1 % glycerol, 1,34 % kvasinková dusíkatá báza, 4×10^{-5} % biotín) 24 hod. pri 30 °C, 180 rpm. Potom boli preočkované do komplexného metanolového média MMY (1 % kvasinkový extrakt, 2 % peptón, 0,5 % metanol, 1,34 % kvasinková dusíkatá báza, 4×10^{-5} % biotín) tak, aby

východisková optická hustota pri 600 nm bola rovná 1. V MMY médiu sa indukovala expresia enzýmov (72 hod pri 30 °C, 180 rpm). Metanol bol pridávaný každých 24 hod. tak, aby jeho výsledná koncentrácia v médiu bola 0,5 %. Rast kmeňov sa sledoval meraním OD pri 600 nm. Supernatant získaný centrifugáciou média (2300 x g, 4 °C, 10 min.) sa dialyzoval 12 hod. oproti fosfátovému tlmivému roztoku (0,05 M NaH₂PO₄ s 0,2 M NaCl, pH 8). Na purifikáciu proteínov bol použitý agarový nosič Ni²⁺ (Ni-NTA Agarose, Jena Bioscience) ekvilibrovaný fosfátovým tlmivým roztokom (0,05 M NaH₂PO₄ s 0,2 M NaCl a 0,003 M histidínom, pH 8). Po 1 hod. inkubácii vzorky (35 ml) s agarom (0,5 ml) pri 4 °C nasledovalo premývanie v kolónke rovnakým tlmivým roztokom, aký bol použitý na ekvilibráciu nosiča (15 x 1 ml). Následne boli elučným tlmivým roztokom (0,05 M NaH₂PO₄ s 0,2 M NaCl, 0,2 M histidínom, pH 8) proteíny vytesnené z kolónky (10 x 1 ml) a dialýzou prevedené do 0,05 M octanového tlmivého roztoku pH 5,5 (4 °C, 16 hod.). Alternatívne sa na purifikáciu týchto proteínov použil aj postup využívajúci na vytesnenie His-tag proteínov z niklového nosiča imidazol (odporúčaný protokol pre Bio-Scale™ Mini Nuvia™ IMAC Ni-Charged Cartridges, Bio-Rad). Eluát bol zahustený ultrafiltráciou na Vivaspín 500 (Sartorius). Vo vzorkách bol stanovený obsah proteínov a enzýmová aktivita. Proteíny boli skladované pri -20 °C.

4.4.3 Expresia, izolácia a purifikácia Crh1 a Crh2

Pracovný postup bol takmer rovnaký ako pri Phr1 a Phr2. Kultúra *P. pastoris* bola inkubovaná v MMY médiu 5 dní pri 20 °C, 160 rpm. Každých 24 hod. sa na indukciu proteínovej expresie pridával metanol tak, aby jeho výsledná koncentrácia v médiu bola 1,25 %.

4.4.4 Stanovenie obsahu proteínov vo vzorkách

Obsah proteínov vo vzorkách bol stanovený pomocou QUBIT® Protein Assay Kit (Life Technologies) podľa predpísaného postupu. Kit obsahuje štandardy s koncentráciou proteínov 0 ng/μl, 200 ng/μl a 400 ng/μl, ktoré sa na meranie pripravili tak, že sa zmiešalo 190 μl tzv. pracovného roztoku (Qubit proteínový tlmivý roztok a Qubit proteínová fluorescenčná reagentia v pomere 200:1) a 10 μl štandardu. Vzorky boli pripravené zmiešaním 195 μl pracovného roztoku a 5 μl enzýmu, nasledovala 15 min. inkubácia pri laboratórnej teplote, meranie v 500 μl čírych mikroskúmavkách (QUBIT® Assay Tubes) v zariadení QUBIT™ Fluorometer (Invitrogen) a výpočet podľa vzťahu 2.

$$\text{Koncentrácia vzorky} = \frac{200}{x} \cdot \text{hodnota z prístroja} = X \mu\text{g/ml} \quad (2)$$

kde x predstavuje množstvo vzorky v μl (5 μl).

4.4.5 Overenie čistoty exprimovaných proteínov pomocou SDS-PAGE

Čistotu proteínov sme kontrolovali pomocou SDS-PAGE [161]. Elektroforéza bola robená na Criterion Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories), ktorý na prípravu gélov využíva jednorazové Criterion kazety (Bio-Rad Laboratories). Najprv bol pripravený 10 % gél, ktorý pozostával z 4,1 ml H₂O, 2,5 ml Tris/HCl pH 8,8 s 0,4 % SDS, 3,3 ml 30 % akrylamidu/bis-akrylamidu, 0,05 ml 10 % persíranu amónneho (APS), 0,005 ml tetrametyletándiamínu (TEMED). Pripravený separačný gél bol naliaty do kazety a po vytuhnutí bol prepláchnutý etanolom a destilovanou vodou. Následne bol pripravený vstupný gél pozostávajúci z 3,075 ml H₂O, 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 s 0,4 % SDS, 0,67 ml 30% akrylamidu/bis-akrylamidu, 0,025 ml 10 % persíranu amónneho (APS) a 0,005 ml tetrametyletándiamínu (TEMED), ktorý bol naliaty na vrch separačného gélu. Do tohto gélu bol zavedený hrebeň na vytvorenie jamiek pre vzorky a štandard. Počas tuhnutia gélu bola pripravená zmes vzoriek a vzorkového tlmivého roztoku (1:4), ktorý pozostával z 4 ml destilovanej vody, 1 ml 0,5 M Tris/HCl, 0,8 ml glycerolu, 1,6 ml 10 % SDS, 0,4 ml β-merkaptóetanolu a 0,2 ml 0,05 % bróm-fenolovej modrej. Následne sa zmes vzoriek a vzorkového tlmivého roztoku zahriali na 95 °C počas 4 min. a po vychladnutí boli scentrifugované (10 000 ot., 1 min.). Po stuhnutí vstupného gélu boli do jamiek nadávkované jednotlivé vzorky a následne aj štandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), s rozsahom molekulových hmotností 0-170 kDa. Do aparatury bol následne pridaný elektródový tlmivý roztok, ktorý bol zložený z 0,125 M Tris pH 8,3, 0,96 M glycínu a 0,5 % SDS. Aparatúra bola uzavretá a následne zapojená na PowerPac Universal Power Supply (Bio-Rad Laboratories), ktorý sa nastavil na konštantný prúd 80 mA. Po ukončení elektroforetického delenia a vybratí gélu z kazety boli proteíny vizualizované pomocou Page-Blue™ Protein Staining Solution (Thermo Scientific) podľa postupu odporúčaného výrobcom.

4.4.6 Identifikácia proteínov v géloch pomocou hmotnostnej spektrometrie

Proteínové pásy z elektroforetického gélu boli spracované podľa protokolu Shevchenko et al. (2006) [162]. Vybrané proteínové pásy z elektroforetického gélu boli vyrezané pomocou skalpela, následne rozrezané na menšie kúsky a prenesené do mikroskúmaviek. Do skúmaviek bolo pridaných 100 μl 100 mM ABC roztoku (100 mM NH₄HCO₃ vo vode) a 400 μl acetonitrilu (ACN). Po prídavku ACN, premiešaní a odstátí po dobu 5 min., bol supernatant odstránený. Ďalším krokom bolo prídanie 50 μl 100 mM ditiotreitolu (DTT), zmes sa nechala inkubovať pri 56 °C po dobu 30 min. v termobloku (Eppendorf ThermoMixer C). Po dokončení inkubácie bolo pridaných 400 μl ACN, nasledovalo premiešanie, odstátie a odsatie supernatantu. Následne bolo do skúmavky pridaných 50 μl 55mM IA (55 mM jódacetamid v 100 mM ABC), zmes sa nechala inkubovať 20 min. v tme. Po dokončení inkubácie bol supernatant, ktorý obsahoval IA odstránený. Do skúmavky bolo pridaných 400 μl 100 mM ABC, zmes sa premiešala, po 5 min. bol supernatant odstránený. Tento krok, až na prídavok ABC, ktorý bol zamenený za ACN, sa zopakoval ešte raz. Ďalším krokom bolo prídanie 10-30 μl trypsinu (Promega). Po približne 2 hod., kedy gélové kúsky nasali roztok, k nim bolo pridaných 20-60

μl 10 mM ABC. Zmes sa nechala inkubovať 18 hod. pri 37 °C. Po skončení inkubácie bolo do skúmavky pridaných 2-6 μl 5 % TFA (kyselina trifluóroctová). Peptidy uvoľnené do supernatantu boli purifikované na mikrokolónke ktorá bola naplnená reverznou fázou Poroshell 300 C-18 (Agilent Technologies) [163]. Mikrokolónka bola najprv navlhčená 25 μl 60 % ACN/0,1 % TFA, potom ekvilibrovaná 25 μl 0,1 % TFA. Po ekvilibracii nasledovala aplikácia 25 μl vzorky. Peptidy boli vytlačané 25 μl gradientom ACN/0,1 % TFA (80-20 %). Eluenty z mikrokolónky boli postupne po kvapkách priamo nanášané na MALDI doštičku MTP 384 AnchorChipTarget (Bruker) a po uschnutí prekryté CHCA matricou. Vzorky boli následne analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie na zariadení MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker). Prístroj bol kalibrovaný na Peptide Calibration Standard II (Bruker). MALDI TOF/TOF MS meranie bolo robené v reflektónovom pozitívnom móde. Napätie použité pri meraniach bolo 20 kV. Spektrálne údaje boli ďalej spracované s použitím ProteinScape v. 3.0 (Bruker). Hodnoty m/z z MS a MS/MS analýz boli spracované pomocou programu Mascot. Na vyhľadávanie v databáze boli použité nasledujúce parametre: databáza - NCBI nr (ver. 27.11.2011); taxonómia - všetky záznamy; enzým - trypsin alebo chymotrypsin; povolené vynechané štiepenia - 1; fixné modifikácie - karbamidometyl (C); variabilné modifikácie - oxidácia (M), pyro-cmC (N-term camC), pyro-glu (N-term E), pyro-glu (N-term Q); peptidová tolerancia - 50 ppm; tolerancia MS/MS - 250 mmu; náboj peptidu- (+1); monoizotopické hodnoty hmotností.

4.5 Stanovenie transglykozylačných aktivít

Vzhľadom na mechanizmus transglykozylačných reakcií (2.5.3) boli pri stanoveniach aktivít použité ako akceptorové substráty oligosacharidy fluorescenčne značené sulforodamínom, neznačené vysokomolekulárne donory a samotné stanovenia boli založené na identifikácii značených produktov po ich oddelení od nezreagovaných značených akceptorov [72].

4.5.1 Stanovenie aktivity pomocou fluorescenčnej „dot-blot“ metódy

Štandardná reakčná zmes pre Phr1 proteíny obsahovala: 10 μl 0,1 M octanového tlmivého roztoku (pH 5,5), 5 μl laminarínu (Lam, 0,5 %), 4 μl značených LaO5-SR (125 μMol), 4 μl enzýmu. Zmes bola inkubovaná 1 hod. pri 30 °C. Reakcia bola zastavená prídavkom 40 % kyseliny mravčej v objemovom pomere 1:1 k objemu reakčnej zmesi. Následne bolo trikrát odobraných 5 μl reakčnej zmesi, ktoré boli nanosené na matricu z filtračného papiera Whatmann 3MM (Sigma-Aldrich, USA). Matrica bola vysušená a následne premývaná po dobu 16 hod. v roztoku 66 % etanolu s 5 % kyseliny mravčej. Potom bola matrica trikrát premývaná po dobu 1 hod. v 66 % etanole. V prvom prípade bola matrica po vysušení skontrolovaná pod UV svetlom (kvalitatívna metóda). V druhom prípade bola matrica uložená medzi dve sklenené platne a následne premeraná na prístroji Mithras² LB943 Multimode Reader (BERTHOLD

Technologies) pri nastaveniach: excitačná a emisná vlnová dĺžka 530 nm a 600 nm (kvantitatívna metóda) [73].

Štandardná reakčná zmes pre Phr2 obsahovala: 10 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku (pH 3,5), 5 µl Lam (0,5 %), 4 µl LaO5-SR (125 µMol), 4 µl enzýmu. Postup bol rovnaký ako v prípade Phr1.

Štandardná reakčná zmes pre Crh proteíny obsahovala: 10 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku (pH 3,5), 5 µl karboxymetyl chitínu (CM-chitín, 2 mg/ml), 4 µl chitoligosacharidu (CH5-SR), 4 µl enzýmu. Postup bol rovnaký ako pri Phr1 a Phr2.

4.5.2 Stanovenie aktivity Phr enzýmov pomocou kvapalinovej chromatografie na molekulovom site

Druhou testovanou metódou bolo stanovenie transglykozylačnej aktivity Phr pomocou HPLC s fluorescenčným detektorom (Dionex Ultimate 3000) využívajúcej kolónu s molekulovým sitom na oddelenie značených produktov od akceptorov [78]. Reakčná zmes v celkovom objeme 250 µl obsahovala identické zložky s pomermi opísanými v 4.5.1. Zmes sa nechala inkubovať pri 25 °C priamo vo vialkách umiestnených v automatickom dávkovači vzoriek HPLC a v rôznych časových intervaloch (0, 40, 80, 120 a 160 min.) bola nastrekovaná na kolónu. Vzorka bola eluovaná mobilnou fázou, 100 mM octanom amónnym pH 5,7 s 20 % ACN, pri prietokovej rýchlosti 0,5 ml/min. Analýza sa uskutočňovala pomocou izokratickej chromatografie na kolóne TSKGel G3000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm (TosoHaas, Tokio, Japonsko). Fluorescenčný detektor bol naprogramovaný na excitačnú a emisnú vlnovú dĺžku 530 nm a 575 nm. Použitý softvér Chromeleon 6.80 (Thermo Scientific, USA) bol využívaný na riadenie zariadenia a získanie údajov.

4.6 Charakterizácia a inhibícia kvasinkových transglykozyláz

4.6.1 Vplyv inhibítorov na aktivitu Phr sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou

Pri testovaní bolo použitých 67 komerčne dostupných inhibítorov z knižnice TargetMol, ktoré sú opísané v 2.8.1. Štrukturálne vzorce inhibítorov sú v Prílohe 1.

Pri skúmaní vplyvu inhibítorov na aktivitu Phr boli pripravené 2 štandardy. Prvý štandard pozostával zo 6 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku pH 5,5 (Phr1) alebo pH 3,5 (Phr2), 3 µl 0,2 % laminarínu, 2 µl LaO5-SR, 1 µl enzýmu. Druhý štandard pozostával z 5 µl 0,1M octanového tlmivého roztoku pH 5,5 (Phr1) alebo pH 3,5 (Phr2), 3 µl 0,2 % laminarínu, 2 µl LaO5-SR, 1 µl enzýmu a 1 µl DMSO. Následne bola pripravená reakčná zmes, ktorá obsahovala 5 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku pH 5,5 (Phr1) alebo pH 3,5 (Phr2), 3 µl 0,2 % laminarínu, 2 µl LaO5-SR, 1 µl inhibítora (1 mmol/l) a 1 µl enzýmu. Vzorky boli

následne inkubované pri 30 °C po dobu 30 min. Posledným krokom bolo pridanie 12 µl 40 % kyseliny mravčej. Vzorky boli následne spracované „dot-blot“ metódou (4.5.1).

4.6.2 Overenie inhibície Phr1 pomocou kvapalinovej chromatografie na molekulovom site

Pre overenie výsledkov s pozitívne zistenou inhibíciou získaných kvantitatívnou „dot-blot“ metódou bola využitá kvapalinová chromatografia na molekulovom site (metóda opísaná v 4.5.2). Reakčná zmes mala identické zloženie ako v prípade 4.5.1, ale jej celkový objem bol 250 µl.

4.6.3 Spôsob účinku Phr enzýmov

Produkty reakcie Phr1 boli sledované pomocou TLC a kvapalinovej chromatografie na molekulovom site.

Reakčná zmes pre TLC obsahovala 25 µl 2 % Lam, 1,5 µl LaO5-SR, 5,5 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku pH 5,5 a 18 µl Phr1. Zmes sa nechala inkubovať pri 25 °C, postupne, v časovom rozmedzí 0-22,5 hod., bola nanášaná na platničku Silikagel 60 (Merck) (po 5 µl). Vyvíjacia zmes obsahovala butanol-etanol-vodu v pomere 5:3:2. Po ukončení vyvíjania a vysušení boli produkty reakcie vizualizované UV svetlom.

Reakčná zmes pre kvapalinovú chromatografiu na molekulovom site obsahovala 125 µl 2 % Lam, 7,3 µl LaO5-SR, 27,7 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku (pH 5,5) a 90 µl Phr1. Zmes sa nechala inkubovať pri 25 °C. 40 µl reakčnej zmesi bolo nastrekovaných na kolónu TSKGel G3000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm (TosoHaas, Tokio, Japonsko) tak, ako bolo opísané v 4.5.2. Podmienky pre stanovenie spôsobu účinku Phr2 boli identické, ale použil sa tlmivý roztok s pH 3,5.

4.6.4 Vplyv stupňa polymerizácie akceptora na afinitu enzýmu Crh2

Pre stanovenie KM ako miery afinity medzi enzýmom Crh2 a laminarioligosacharidmi s rôznym stupňom polymerizácie boli použité tri akceptory, LaO4 (laminaritetraóza, 350 µM), LaO5 (laminaripentaóza, 308,75 µM), LaO6 (laminarihexaóza, 300 µM). Reakčná zmes obsahovala 10 µl 0,1 M octanového tlmivého roztoku (pH 3,5), 5 µl CM-chitínu (2 mg/ml) a 5 µl enzýmu Crh2. Na začiatku stanovenia boli pripravené dva rady 7 mikroskúmaviek pre každý akceptor. Do jednotlivých mikroskúmaviek boli postupne napipetované zvyšujúce sa množstvá akceptorov (1 µl; 4 µl; 7 µl; 10 µl; 13 µl; 16 µl; 19 µl). Po napipetovaní akceptorov boli mikroskúmavky vysušené vo vákuovom koncentrátore (Eppendorf Concentrator Plus). Ako blank bolo použitých prvých 7 mikroskúmaviek, kam bolo ihneď po vysušení akceptorov

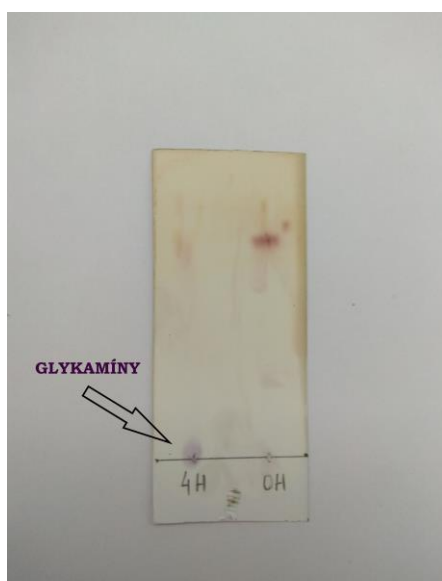
napipetovaných 10 μ l 40 % kyseliny mravčej. Potom bolo do mikroskúmaviek pridaných 10 μ l reakčnej zmesi. Rovnaký postup, až na prídavok kyseliny mravčej v druhom kroku, sa opakoval aj pre ďalších 7 mikroskúmaviek, ktoré boli určené na inkubáciu po dobu 90 min. v termobloku s teplotou 30 °C. Po ukončení inkubácie bolo do mikroskúmaviek napipetovaných 10 μ l 40 % kyseliny mravčej. Jednotlivé vzorky boli po ukončení reakcie nanášané trikrát v množstve 6 μ l na filtračný papier Whatmann 3MM (Sigma Aldrich, USA). Aktivity boli stanovené „dot-blot“ metódou (kapitola 4.5.1).

5 VÝSLEDKY

5.1 Fluorescenčné značenie oligosacharidov

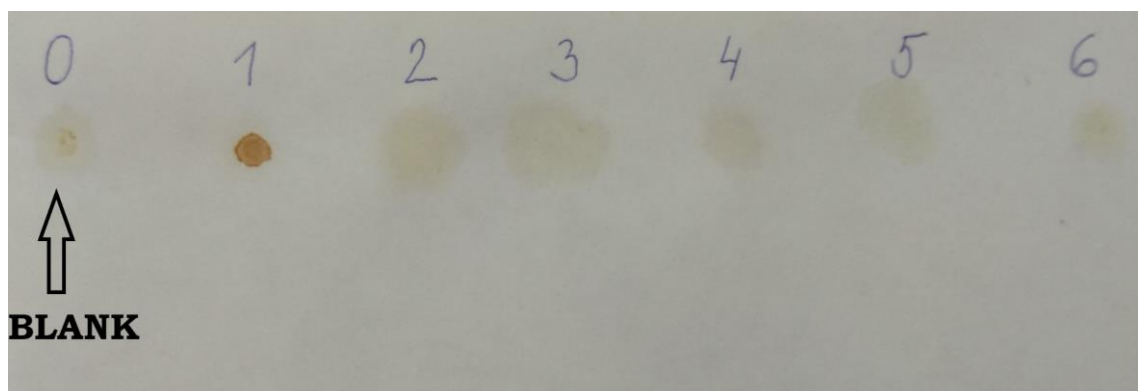
5.1.1 Aminácia pentalaminarioligosacharidu

Fluorescenčné značenie oligosacharidov zahŕňalo ako prvý krok amináciu, ktorej výsledkom bol v našom prípade vznik aminovaného LaO5 (glykamínu) [159]. Jeho prítomnosť bola overená pomocou tenkovrstvovej chromatografie (kapitola 4.3.1). Glykamíny (4H) sa v použitej vyvíjacej zmesi nepohybovali a na rozdiel od pôvodného LaO5 (OH) ostali na štarte (obrázok č. 17).



Obrázok 17: TLC LaO5 (označenie 0H) a jeho glykamínu (4H) po detekcii platničky orcinolom

Zo vzniknutých glykamínov vo forme zrazeniny bolo nutné odstrániť amónne ióny, ktorých prítomnosť bola overovaná pomocou Nessleroveho činidla (obrázok č. 18).



Obrázok 18: Kontrola prítomnosti amónnych iónov v zrazenine glykamínu Nesslerovým činidlom

5.1.2 Zavedenie fluorescenčnej značky do glykamínu LaO5

Po inkubácii, kedy došlo k integrácii glykamínov so sulforodamínom za vzniku fluorescenčne značených oligosacharidov, bolo nutné odstrániť nezreagovaný sulforodamín (kapitola 4.3.2). Supernatanty po premytí acetónom sú znázornené na obrázku č. 19.

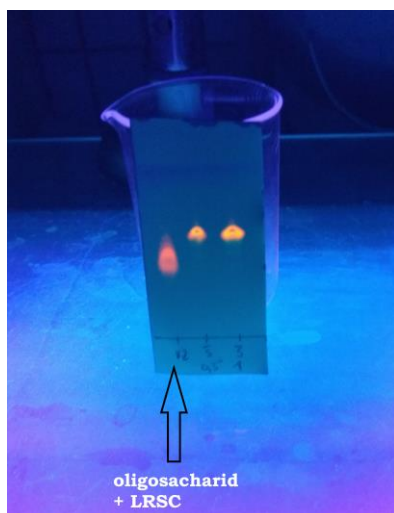


Obrázok 19: Premývanie zrazeniny LaO5-SR od nezreagovaného SR – supernatanty po premytí acetónom

Po odstránení nezreagovaného SR nasledovalo spektrofotometrické stanovenie koncentrácie produktu. Koncentrácia LaO5-SR bola stanovená meraním pri 566 nm, vypočítaná podľa vzťahu 1 a stanovená na $6,775 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

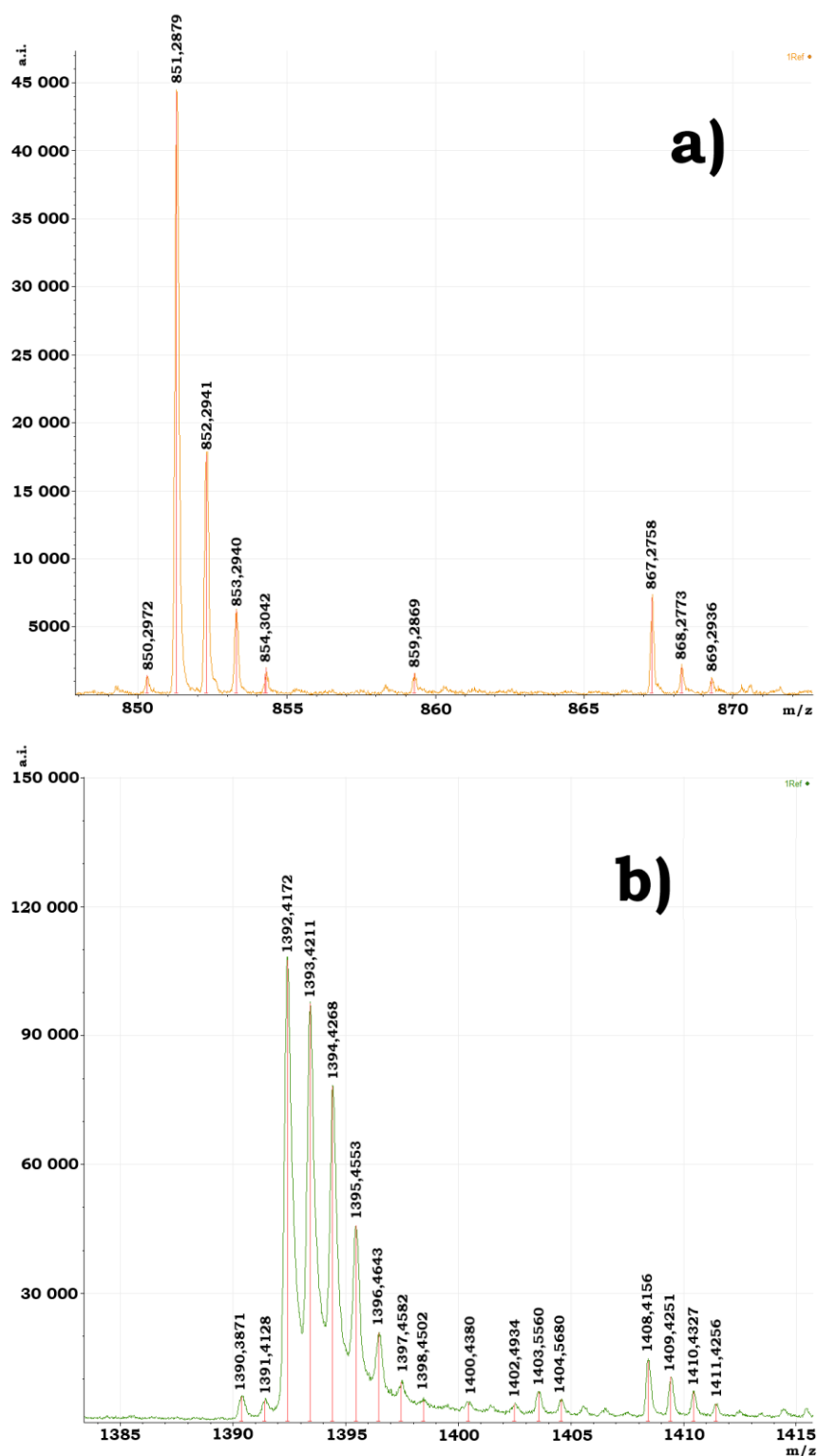
5.1.3 Prečistenie fluorescenčne značeného produktu

Po prečistení produktu na kolónke bola realizovaná kontrola čistoty fluorescenčne značeného produktu na TLC platni (obrázok č. 20) a pomocou MALDI-TOF analýzy (obrázok č. 21). Na obrázku č. 20 je možné vidieť sulforodamínom značený LaO5 a SR, ktorý postupoval mobilnou fázou o niečo rýchlejšie ako LaO5-SR.



Obrázok 20: Kontrola čistoty pripraveného LaO5-SR TLC. Ako štandard bol použitý SR

Preverenie čistoty východzieho materiálu LaO5 a produktu LaO5-SR je znázornené na obrázku č. 21 a tabuľke č. 2. Na obrázku a) je možné vidieť $[\text{LaO5} + \text{Na}]^+$ o experimentálnej m/z 851,2879 a $[\text{LaO5} + \text{K}]^+$ o experimentálnej m/z 867,2758. Obrázok b) predstavuje spektrum nami sulforodamínom značeného LaO5, kde je možné vidieť $[\text{LaO5-SR} + \text{Na}]^+$ o experimentálnej m/z 1392,4172 a $[\text{LaO5} + \text{K}]^+$ o experimentálnej m/z 1408,4156.



Obrázok 21: Preverenie čistoty východzieho materiálu (LaO5) a produktu (LaO5-SR) hmotnostnou spektrometriou a) LaO5 b) LaO5-SR

Tabuľka 2: Stanovenie LaO5 a LaO5-SR pomocou hmotnostnej spektrometrie

Látka	Typ iónu	Teoretická m/z	Experimentálna m/z	$\pm \Delta$	Identifikácia
LaO5	$[\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26} + \text{Na}]^+$	851,2645	851,2879	0,0234	$[\text{LaO5} + \text{Na}]^+$ (neznačaná akceptor)
LaO5	$[\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26} + \text{K}]^+$	867,2384	867,2758	0,0374	$[\text{LaO5} + \text{K}]^+$ (neznačaná akceptor)
LaO5-SR	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	1392,4350	1392,4172	0,0178	$[\text{LaO5-SR} + \text{Na}]^+$ (akceptor)
LaO5-SR	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 + \text{K}]^+$	1408,4089	1408,4156	0,0067	$[\text{LaO5-SR} + \text{K}]^+$ (akceptor)

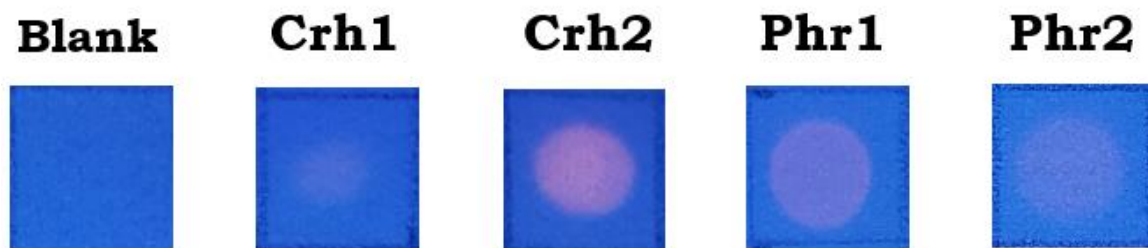
Prečistením produktu na kolónke sme docielili odstránenie zvyškov sulforodamínu. Získali sme 2 ml LaO5-SR. Koncentrácia LaO5-SR bola stanovená spektrofotometrickým meraním pri 566 nm, vypočítaná podľa vzťahu 1 a stanovená na $3,088 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V porovnaní s koncentráciou po prezrážaní sa koncentrácia produktu po prečistení na kolónke znížila takmer o 46 %.

LaO5-SR sa v rámci diplomovej práce využíval ako značený akceptor v transglykozylačných reakciách katalyzovaných enzýmami Phr1, Phr2 a Crh1, Crh2.

5.2 Identifikácia exprimovaných proteínov a stanovenie ich aktivity a koncentrácie

5.2.1 Stanovenie aktivity exprimovaných enzýmov pomocou kvalitatívnej fluorescenčnej „dot-blot“ metódy

Na stanovenie aktivít transglykozyláz izolovaných z médií po kultiváciách kmeňov *P. pastoris* bola použitá fluorescenčná „dot-blot“ metóda. Donormi v reakciách boli laminarín (Phr enzýmy), karboxymetyl chitín (Crh) a akceptormi boli fluorescenčne značené oligosacharidy. Výsledkom reakcie boli produkty zložené z molekúl fluorescenčne značeného akceptora a fragmentu donora s pôvodným neredukujúcim koncom, ktoré ostali naviazané na papieri. Nezreagované fluorescenčne značené oligosacharidy boli z papiera vymyté 66 % etanolom. Zabudovaná fluorescencia bola detegovaná pod UV svetlom (kvalitatívna metóda) alebo na spektrometri MITHRAS2 LB 943 (kvantitatívna metóda). Kvalitatívne stanovenie transglykozylačných aktivít je znázornené na obrázku č. 22. Enzým Crh2 vykazoval najvyššiu aktivitu, zatiaľ čo aktivita enzýmu Crh1 detegovaná nebola.



Obrázok 22: Stanovenie transglykozylačných aktivít exprimovaných enzýmov pomocou fluorescenčnej "dot-blot" metódy

5.2.2 Stanovenie obsahu exprimovaných proteínov v prečistených vzorkách

Podľa predpísaného postupu QUBIT[®] Protein Assay Kit (Life Technologies) bol stanovený obsah proteínov vo vzorkách z kultivačného média, vzorkách purifikovaných na Ni-NTA Agarose a vzorkách po zahustení na Vivaspin 500. Hodnoty koncentrácií sú znázornené v tabuľke č. 3.

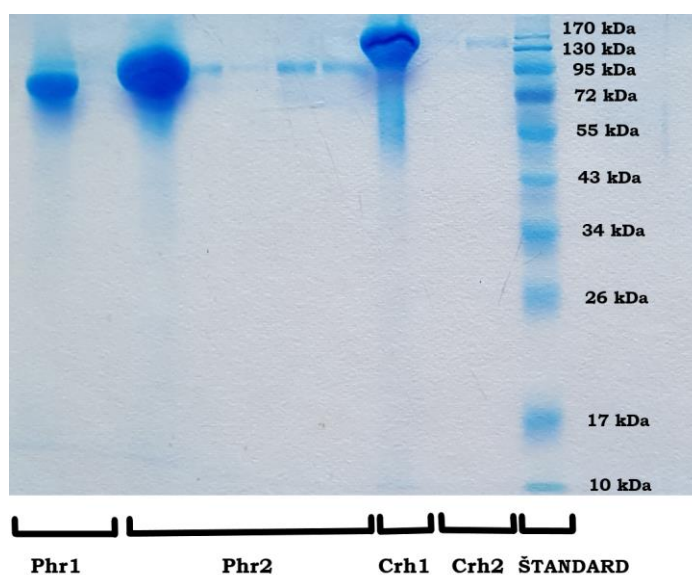
Tabuľka 3: Koncentrácie proteínov vo vzorkách po purifikácii a zahustení

Enzým	Proteíny purifikované na Ni-NTA Agarose [µg/ml]	Proteíny po zahustení na Vivaspin 500 [µg/ml]
Crh1	736	800
Crh2	132	544
Phr1	44	67,6
Phr2	108	524

V prípade enzýmu Phr1 a hodnoty jeho aktivity stanovenej fluorescenčnou „dot-blot“ metódou (obrázok č. 22) je možné hovoriť o vysokej špecifickej aktivite enzýmu. U enzýmu Crh1 bol pozorovaný vysoký obsah proteínov, avšak nulová aktivita.

5.2.3 Overenie čistoty exprimovaných proteínov pomocou SDS-PAGE

Molekulová hmotnosť enzýmov Phr1, Phr2, Crh1 a Crh2 bola stanovená pomocou SDS-PAGE (obrázok č. 23). Štandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder slúžil na stanovenie molekulových hmotností prečistených proteínov. Jednotlivé vzorky boli nanášané v množstvách 1-5 μ l v závislosti od ich koncentrácie stanovenej fluorescenčnou metódou (tabuľka č. 3). Molekulová hmotnosť enzýmu Phr1 je približne 93 kDa a enzýmu Phr2 približne 97 kDa. Molekulová hmotnosť enzýmov Crh1 a Crh2 je v porovnaní s enzýmami Phr vyššia. Stanovením molekulových hmotností týchto enzýmov sa zaoberali aj Mazán et al. (2013) a Kováčová et al. (2015). Hodnoty stanovených molekulových hmotností sú v zhode.



Obrázok 23: SDS- PAGE enzýmov Phr1, Phr2, Crh, Crh2

5.2.4 Identifikácia proteínov pomocou tryptického štiepenia

Vzhľadom na značný rozpor medzi množstvom exprimovaného proteínu a úplnou absenciou enzýmovej aktivity vo vzorke, ktorá by mala obsahovať enzým Crh1, sa urobilo tryptické štiepenie proteínov v géli po SDS-PAGE (2.4.6). Po uvoľnení peptidov do roztoku sa rozdelili na mikrokolónke obsahujúcej nosič deliaci na princípe reverznej fázy. MS a MS/MS spektrá sa získali na zariadení MALDI TOF/TOF a na ich základe boli stanovené m/z peptidov a u vybraných peptidov aj ich sekvencie (tabuľky č. 4-6). Databázové vyhľadávanie potom umožnilo identifikáciu daného proteínu a vizualizáciu umiestnenia identifikovaných sekvencií v rámci jeho molekuly. M/z peptidov a ich sekvencie identifikované pre enzým Phr1 sú znázornené v tabuľke č. 4. Obrázok č. 24 zobrazuje umiestnenie týchto sekvencií v rámci molekuly Phr1.

Tabuľka 4: Identifikované sekvencie enzýmu Phr1 a ich m/z (prvé písmeno pred bodkou a posledné písmeno za bodkou označujú poslednú a prvú aminokyselinu predchádzajúcej a nasledujúcej sekvencie)

Identifikované sekvencie	m/z
K.ESNTNTRLR.V	934,4288
R.NNPEWNLDLYK.R	1405,6239
R.LFQEIGTLYSDK.M	1413,7323
K.FESSTPPVEVVGK.F	1489,6918
K.GEYGVASFCDKDR.L	1590,6251
R.VAIADYFSCGSLDDR.A	1688,8209
R.QIPVGYSSNDDEEIR.V	1721,8379
R.LSYVLNQYYLDQDKK.S	1890,8932
R.GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNR.K	2242,9424
R.GIAYQQDAAGSVSSGYDADPNR.K.Y	2370,1284
K.IFSDAGIYIVADLSEPTVSINR.N	2380,2627

Počet aminokyselín v identifikovaných sekvenciách v pomere k celkovému počtu aminokyselín v proteíne (548) vyjadruje 27 % pokrytie proteínovej sekvencie.

```

1  MYSLIKSLAT  FATLFSLTLA  KFESSTPPVE  VVGKFYFSN  NGSQFLIRGI

51  AYQQDAAGSV  SSGYDADPNR  KYNDPLADAD  ACKRDVKYFK  ESNTNTRLRVY

101  AIDPDKDHEE  CMKIFSDAGI  YIVADLSEPT  VSINRNNPEW  NLDLYKRYTK

151  VIDKMQEYSN  VLGFFAGNEV  TNNRSNTDAS  AFVKAAIRDM  KKYIKESDYR

201  QIPVGYSSND  DEEIRVAIAD  YFSCGSLDDR  ADFFGINMYE  WCGKSTFETS

251  GYKDRTEEIK  NLTIPAFFSE  YGCNANRPRL  FQEIGTLYSD  KMTDVWSGGI

301  VYMYFEEANK  YGLVSVDGNS  VKTSLDYNNY  KSEMKNISPS  LAHTSTLSSS

351  DASKTLQCPG  TAASTWKAAT  NLPPTPDESY  CDCISKSLEC  VVADDVDKED

401  YGDLFGQVCG  YIDCSAISAD  GSKGEYGVAS  FCSDKDRLSY  VLNQYYLDQD

451  KKSSACDFKG  SASINSKASA  SGSCKAVSGV  ATGKASSSGG  SSKSGSSSAS

501  ASGSSSSSTS  SGSSSSSGVK  ATQQMSMVKL  VSIITIVTAF  VGGMSVVF

```

Obrázok 24: Primárna štruktúra P43076_Phr1 (548 aminokyselín). Identifikované sekvencie sú označené červenou farbou

Identifikované sekvencie enzýmu Phr2 sú znázornené v tabuľke č. 5. Obrázok č. 25 zobrazuje umiestnenie týchto sekvencií v rámci molekuly Phr2.

Tabuľka 5: Identifikované sekvencie enzýmu Phr2 a ich m/z (prvé písmeno pred bodkou a posledné písmeno za bodkou označujú poslednú a prvú aminokyselinu predchádzajúcej a nasledujúcej sekvencie)

Identifikované sekvencie	m/z
R.DDPSWDLDLFER.Y	1507,7362
R.SIPVGYSANDDSAIR.V	1564,7866
R.DIPYLEAVDTNVIR.V	1617,8978
K.LSFVMNLYYEQNK.E	1648,8680
K.NLGIIPIFFSEYGCNEVRPR.K	2268,1672

Počet aminokyselín v identifikovaných sekvenciách v pomere k celkovému počtu aminokyselín v proteíne vyjadruje 13 % pokrytie proteínovej sekvencie.

```

1  MLLKSLFPSI LAATSFVSSV AAEDLPAIEI VGNKFFYSNN GSQFYIKGIA
51 YQQNNLDSNE SFVDPLANPE HCKRDIPYLE AVDTNVIRVY ALDTSQDHTE
101 CMQMLQDAGI YVIADLSQPD ESINRDDPSW DLDLFERYTS VVDLFHNYTN
151 ILGFFAGNEV TNKKSNTDAS AFVKAAIRDY KAYIKSKGYR SIPVGYSAND
201 DSAIRVSLAD YFACGDEDEA ADFFGINMYE WCGDSSYKAS GYESATNDYK
251 NLGIIPIFFSE YGCNEVRPRK FTEVATLFGD QMTPVWSGGI VYMYFEEENN
301 YGLVSIKDNT VSTLKDYSY SSEIKDIHPS SAKASAESAS SISRTTCPTN
351 TNNWEASTNL PPTPDKEVCE CMSASLKCIV DDKVDSDDYS DLFSYICAKI
401 DCDGINANGT TGEYGAYSPC HSKDKLSFVM NLYYEQNKES KSACDFGGSA
451 SLQSAKTASS CSAYLSSAGS SGLGTVSGTV RTDTSQSTSD SGSGSSSSSS
501 SSSSSSSSGS SGSKSAASIV SVNLLTKIAT IGISIVVGFG LITM

```

Obrázok 25: Primárna štruktúra O13318_Phr2 (544 aminokyselín). Identifikované sekvencie sú označené červenou farbou

Identifikované sekvencie enzýmu Crh2 sú znázornené v tabuľke č. 6. Obrázok č. 26 zobrazuje umiestnenie týchto sekvencií v rámci molekuly Crh2.

Tabuľka 6: Identifikované sekvencie Crh2 a ich m/z (prvé písmeno pred bodkou a posledné písmeno za bodkou označujú poslednú a prvú aminokyselinu predchádzajúcej a nasledujúcej sekvencie)

Identifikované sekvencie	m/z
K.FKDYSSK.L	874,4617
K.NSGGTVLSSTR.A	1078,5476
K.YQYPQTPSK.V	1111,5823

Počet aminokyselín v identifikovaných sekvenciách v pomere k celkovému počtu aminokyselín v proteíne vyjadruje 5 % pokrytie proteínovej sekvencie.

```

1  MAIVNSWLIC LVSIFS FVVR VEAATFCNAT QACPEDKPCC SQYGECGTGQ
51  YCLNNCDVRY SFSHDSCMPV PICKSSSTKF KDYSSKLGNA NTFLGNVSEA
101 DWLYTGDVLD YDDEESLILA MPKNSGGTVL SSTRAVWYGK VSARIKTSHL
151 AGVVTGFILY SGAGDELDYE FVGADLETAQ TNFYWESVLN YTNSANISTT
201 DTFENYHTYE LDWHEDYVTW SIDGVVGR TL YKNETYNATT QKYQYPQTPS
251 KVDISIWP GG NSTNAPGTIA WSGGEINWDA SDISNPGYYY AIVNEVNITC
301 YDPPSDTKKN GTSAYVYTSS SEFLAKDIAI TDDEVMMDS D EGSGLDPHKG
351 ATTSSTQKSS SSTATSSSKT SSDHSSSTKK SSKTSSTASS SSSSSSSSSS
401 SSSTATKN GD KVVSSVSSSV TSQTQTTSSV SGSASSSTSS MSGNNAGANV
451 AANWRLTVLC VILGYVL

```

Obrázok 26: Primárna štruktúra P32623_Crh2 (544 aminokyselín). Identifikované sekvencie sú označené červenou farbou

Štruktúra Crh1 vo vzorke identifikovaná nebola. Z tohto dôvodu sa ďalej pracovalo iba s enzýmami Phr1, Phr2 a Crh2.

5.3 Charakterizácia a inhibícia kvasinkových transglykozyláz

5.3.1 Vplyv inhibítorov na Phr1 sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou

Doposiaľ neboli publikované žiadne informácie o inhibítoroch enzýmov Phr1 a Phr2. Vzhľadom na fakt, že takéto inhibítory by boli cielene zamerané na bunkovú stenu patogénov, ktorú živočíšna bunka nemá, mohol by sa jeden z možných smerov vývoja nových antimykotík s menším počtom nepriaznivých účinkov na organizmus zamerať práve na tieto enzýmy. Komerčná knižnica inhibítorov TargetMol by mohla poskytnúť prvé informácie o potenciálnych inhibítoroch, ktoré by sa následne použili ako základ pre modelovanie účinnejších foriem. Skrining 67 inhibítorov z tejto knižnice fluorescenčnou „dot-blot“ metódou naznačil, že berberín hydrochlorid a mikonazol nitrát by mohli mať významnejší inhibičný účinok na enzým Phr1 (tabuľka č. 7). V tejto tabuľke je znázornené percentuálne vyjadrenie aktivity enzýmu po účinku inhibítorov, kde 100% aktivitu enzýmu predstavuje jeho aktivita bez inhibítora.

Tabuľka 7: Aktivity enzýmu Phr1 po pôsobení komerčne dostupných inhibítorov (knižnica TargetMol)

Inhibítor	hexatidín	berberín hydrochlorid	hydroxychinolín	dichlorofén
Aktivita [%]	106,08	3,49	67,27	115,74
Inhibítor	vagistat	amorolfín hydrochlorid	sulbentín	mikonazol
Aktivita [%]	107,59	120,41	65,81	112,66
Inhibítor	kryštálová violet	pyritión zinku	klotrimazol	tiomersal
Aktivita [%]	80,85	55,85	56,35	71,09
Inhibítor	mikonazol nitrát	dequalínium chlorid	fluorocytozín	itrakonazol
Aktivita [%]	0,27	118,39	114,38	110,31
Inhibítor	amfotericín B	tolnaftát	ciklopirox etanolamín	imazalil
Aktivita [%]	113,93	121,62	118,62	165,54
Inhibítor	oxikonazol nitrát	triklosan	2,3-dichlóranizol	bifonazol
Aktivita [%]	119,18	134,53	122,92	131,06
Inhibítor	butenafín hydrochlorid	sklareolid	kyselina gibereľová	piroktol olamín
Aktivita [%]	136,19	138,71	118,77	117,76
Inhibítor	pimaricín	ketokonazol	pravastatín sodný	octan fenylortuťnatý

Aktivita [%]	139,57	132,11	134,14	121,91
Inhibítor	salicylanilid	undecylenát zinočnatý	kliočinol	chloroxylenol
Aktivita [%]	118,21	132,58	124,99	116,13
Inhibítor	chlorobutanol	kyselina salicylová	magnolol	chlórchinaldín
Aktivita [%]	131,41	138,80	151,47	112,48
Inhibítor	spektinomycín dihydrochlorid	tiabendazol	trometamol	flukonazol
Aktivita [%]	121,69	124,73	161,07	132,44
Inhibítor	klimbazol	terbinafin hydrochlorid	mechlóretamín hydrochlorid	butokonazolnitrát
Aktivita [%]	135,21	133,80	115,84	143,60
Inhibítor	ciklopirox	nifuratel	naftifín hydrochlorid	nystatín
Aktivita [%]	143,59	133,57	134,67	117,20
Inhibítor	lulikonazol	pentamidín izotionát	isavukonazol	efinakonazol
Aktivita [%]	124,40	125,47	130,77	120,99
Inhibítor	karbendazím	myklobutanil	ekonazol nitrát	PMD
Aktivita [%]	120,76	123,80	119,72	120,34
Inhibítor	kasugamycín hydrochlorid	vorikonazol	hygromycín B	mikafungín sodný
Aktivita [%]	113,21	115,20	121,28	95,98
Inhibítor	liranaftát	kaspofungín	antimycín A	
Aktivita [%]	111,03	105,33	107,66	

Vzhľadom na to, že “dot-blot” metóda je síce veľmi vhodná na rýchly skrining transglykozylačných aktivít, ale jej výsledky môžu byť skreslené prítomnosťou látok, ktoré môžu ovplyvňovať viazanie alebo uvoľňovanie produktov z papierovej matrice [78], bolo potrebné jej výsledky overiť ešte inou metódou. Vybrali sme metódu oddelenia značených produktov s vyššou molekulovou hmotnosťou od nízkomolekulárnych značených akceptorov pomocou molekulového sita.

5.3.2 Vplyv inhibítorov na aktivitu Phr2 sledovaný fluorescenčnou „dot-blot“ metódou

Percentuálne vyjadrenie aktivity Phr2 po pôsobení inhibítorov je znázornené v tabuľke 8. Ani jedna zo 67 látok z komerčnej knižnice TargetMol nemala inhibičný účinok na tento enzým.

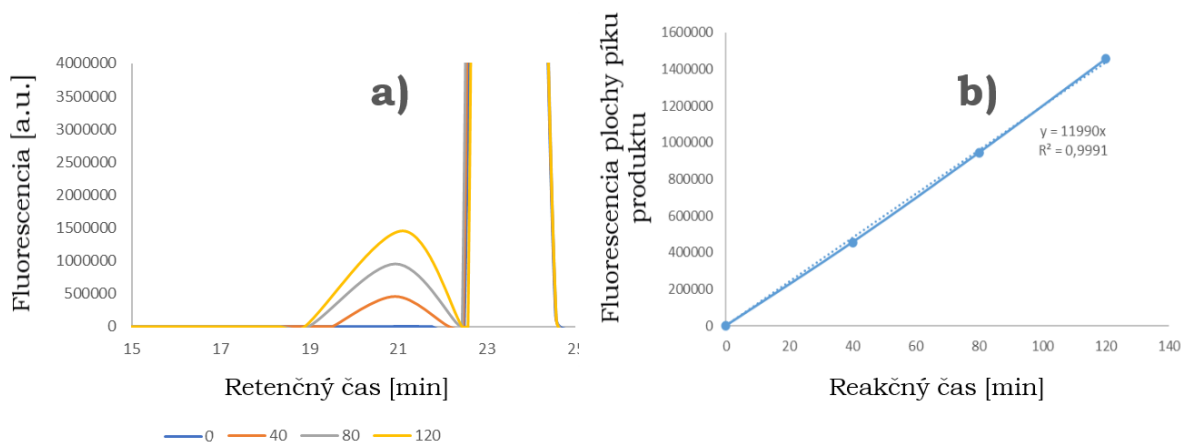
Tabuľka 8: Aktivity enzýmu Phr2 po pôsobení 67 komerčne dostupných inhibítorov

Inhibítor	hexatidín	berberín hydrochlorid	hydroxychinolín	dichlorofén
Aktivita [%]	110,22	100,06	120,40	100,08
Inhibítor	vagistat	amorolfín hydrochlorid	sulbentín	mikonazol
Aktivita [%]	108,57	108,28	105,02	99,92
Inhibítor	kryštálová violet	pyritión zinku	klotrimazol	tiomersal
Aktivita [%]	106,45	83,16	83,06	120,78
Inhibítor	mikonazol nitrát	dequalínium chlorid	fluorocytozín	itrakonazol
Aktivita [%]	124,06	133,80	106,62	110,20
Inhibítor	amfotericín B	tolnaftát	ciklopirox etanolamín	imazalil
Aktivita [%]	109,37	96,96	97,54	94,37
Inhibítor	oxikonazol nitrát	triklosan	2,3-dichlóranizol	bifonazol
Aktivita [%]	109,09	112,33	108,06	115,96
Inhibítor	butenafín hydrochlorid	sklareolid	kyselina gibereľová	pirokton olamín
Aktivita [%]	113,51	116,53	103,03	117,50
Inhibítor	pimaricín	ketokonazol	pravastatín sodný	octan fenyloctanový
Aktivita [%]	101,71	102,65	114,78	134,64
Inhibítor	salicylanilid	undecylenát zinočnatý	kliochinol	chloroxylénol
Aktivita [%]	127,97	115,35	120,30	102,76
Inhibítor	chlorobutanol	kyselina salicylová	magnolol	chlórchinaldín
Aktivita [%]	120,05	103,18	107,2	98,25
Inhibítor	spektinomycín dihydrochlorid	tiabendazol	trometamol	flukonazol

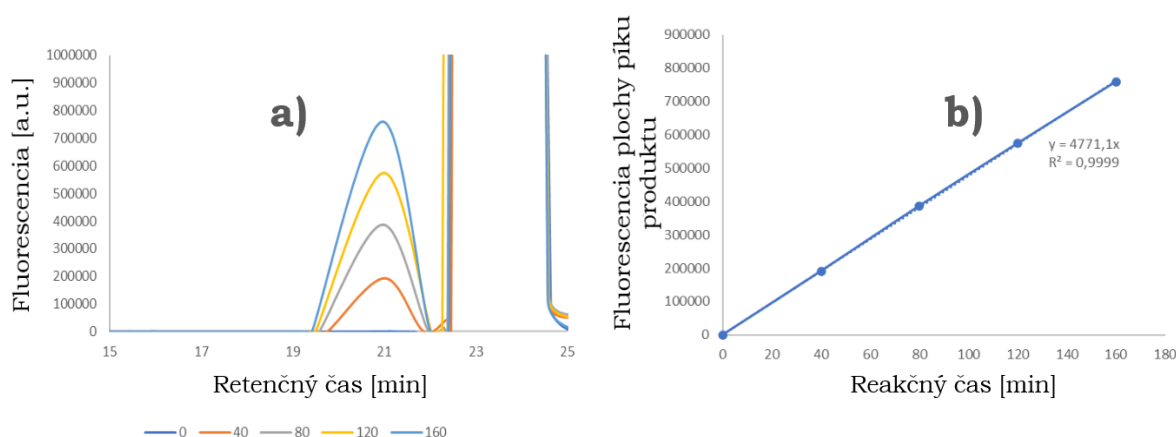
Aktivita [%]	112,71	131,56	128,44	130,15
Inhibítor	klimbazol	terbinafin hydrochlorid	mechlóretamín hydrochlorid	butokonazolnitrát
Aktivita [%]	129,30	121,98	114,82	125,36
Inhibítor	ciklopirox	nifuratel	naftifin hydrochlorid	nystatín
Aktivita [%]	102,03	98,37	122,00	139,30
Inhibítor	lulikonazol	pentamidín izotionát	isavukonazol	efinakonazol
Aktivita [%]	133,91	125,13	96,86	120,48
Inhibítor	karbendazím	myklobutanil	ekonazol nitrát	PMD
Aktivita [%]	125,79	122,56	117,23	114,07
Inhibítor	kasugamycín hydrochlorid	vorikonazol	hygromycín B	mikafungín sodný
Aktivita [%]	121,00	133,83	114,95	186,66
Inhibítor	liranaftát	kaspofungín	antimycín A	
Aktivita [%]	126,74	121,95	133,66	

5.3.3. Overenie vplyvu inhibítorov berberín hydrochlorid a mikonazol nitrát na aktivitu enzýmu Phr1 metódou delenia značených produktov a substrátov na molekulovom site

Ako bolo spomenuté vyššie (5.3.1), fluorescenčná „dot-blot“ metóda je rýchla a preto vhodná na skrining väčšieho množstva vzoriek. Na druhej strane môžu byť výsledky v prípade, že sa nepoužívajú identické reakčné zmesi, ovplyvnené prítomnosťou látok, ktoré spôsobujú rozdielnu interakciu produktov s papierovou matricou. Práve preto je pozitívne výsledky nevyhnutné overiť. Ako vhodná metóda pre porovnanie účinku rôznych substrátov na aktivitu inej transglykozylázy, XET z rastlín, bola použitá kvapalinová chromatografia na kolóne naplnenej inertným molekulovým sitom [78]. Identická kolóna a zariadenie HPLC s fluorescenčným detektorom bolo použité aj na overenie inhibičného účinku berberín hydrochloridu a mikonazol nitrátu na aktivitu Phr1. Kvantitatívne vyhodnotenie aktivít bolo založené na meraní nárastu plochy píku produktu v priebehu reakcie a vyjadrené v % relatívnej aktivity, pričom za 100 % sa považovala aktivita enzýmu bez inhibítora. Keďže všetky inhibítory sú rozpustené v DMSO, porovnávala sa aj aktivita Phr1 v tlmivom roztoku a DMSO. Stanovenie transglykozylačnej aktivity Phr1 v tlmivom roztoku a s DMSO je znázornené na obrázkoch č. 27 a 28.



Obrázok 27: Stanovenie aktivity enzýmu Phr1 s akceptorom LaO5-SR a donorom Lam v octanovom tlmivom roztoku. a) meranie nárastu fluorescencie produktu v závislosti od doby inkubácie reakčnej zmesi b) závislosť plochy píku produktu transglykozylačnej reakcie katalyzovanej enzýmom Phr1 v octanovom tlmivom roztoku na dobu reakcie

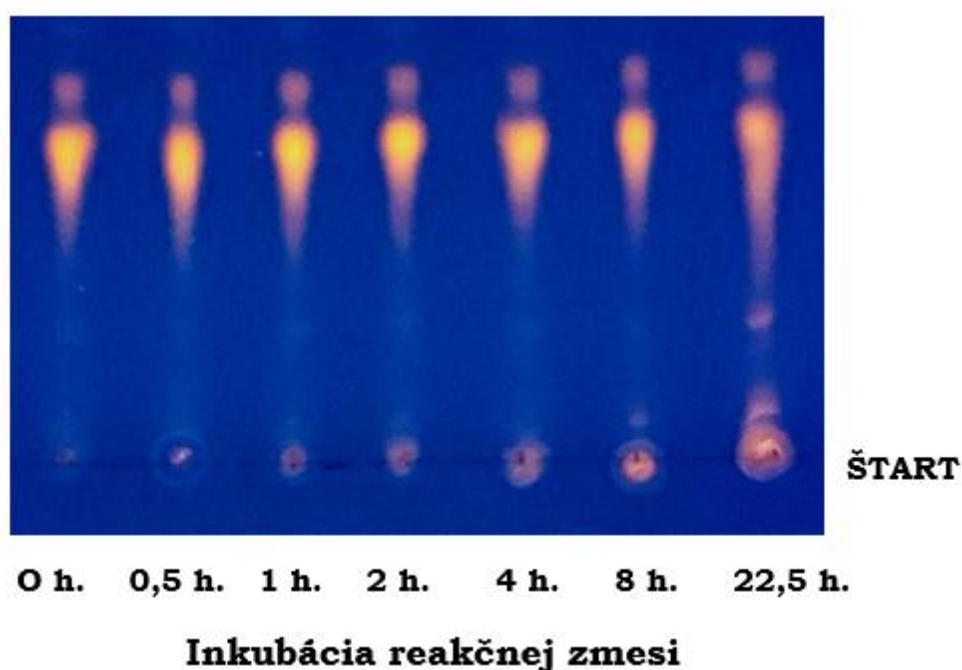


Obrázok 28: Stanovenie aktivity enzýmu Phr1 s akceptorom LaO5-SR a donorom Lam v octanovom tlmivom roztoku. Reakcia sa uskutočnila s prídavkom DMSO a) meranie nárastu fluorescencie produktu v závislosti od doby inkubácie reakčnej zmesi b) závislosť plochy píku produktu transglykozylačnej reakcie katalyzovanej enzýmom Phr1 v octanovom tlmivom roztoku s prídavkom DMSO na dobu reakcie

Phr1 vykazoval v prítomnosti DMSO nižšiu aktivitu o 60,21 %, teda jeho aktivita bola na úrovni 39,79 % v porovnaní s aktivitou nameranou v octanovom tlmivom roztoku. Na rozdiel od DMSO, prídavok berberín hydrochloridu alebo mikonazol nitrátu aktivitu Phr1 neovplyvnil. Z týchto výsledkov vyplýva, že žiaden z komerčných inhibítorov, ktoré obsahuje knižnica TargetMol nemal vplyv na transglykozylázy Phr z rodiny GH 72 rovnako, ako boli tieto inhibítory neúčinné na transglykozylázy rodiny GH 16, kvasinkovú Crh a rastlinnú XET [164][165].

5.3.4 Spôsob účinku Phr enzýmov sledovaný pomocou TLC a kvapalinovej chromatografie na molekulovom site

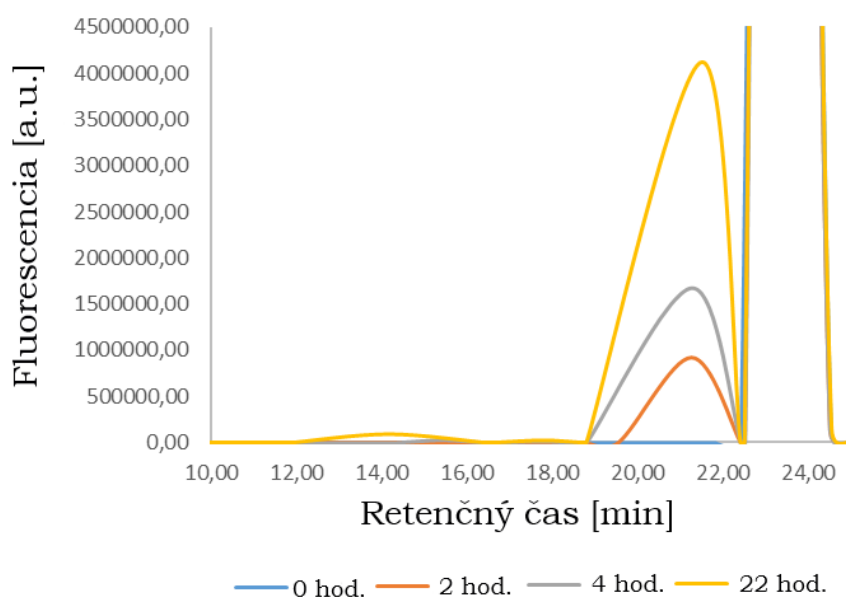
Štúdium spôsobu účinku enzýmu Phr1 sa zaoberala už Kováčová a kol. (2015). Produkty vzniknuté transglykozylačnou reakciou rozdelili pomocou TLC (obrázok č. 13) a po elúcii zo silikagélu identifikovali hmotnostnou spektrometriou. Autori konštatovali, že súčasne vznikajú produkty s rôznymi molekulovými hmotnosťami, od oligosacharidov až po polyméry. Keďže práca neukázala produkty reakcie v počiatočných fázach reakcie, ale až po 16 hod., snažili sme sa výsledky zreprodukovať pre kratšie časové intervaly (obrázok č. 29). Ako vyplýva z obrázku, evidentným dôvodom, prečo sa v práci zaoberali až produktami po 16 hod. inkubácii Phr1 so substrátmi bol fakt, že vzorky z kratších časových intervalov sa identifikovať nedali.



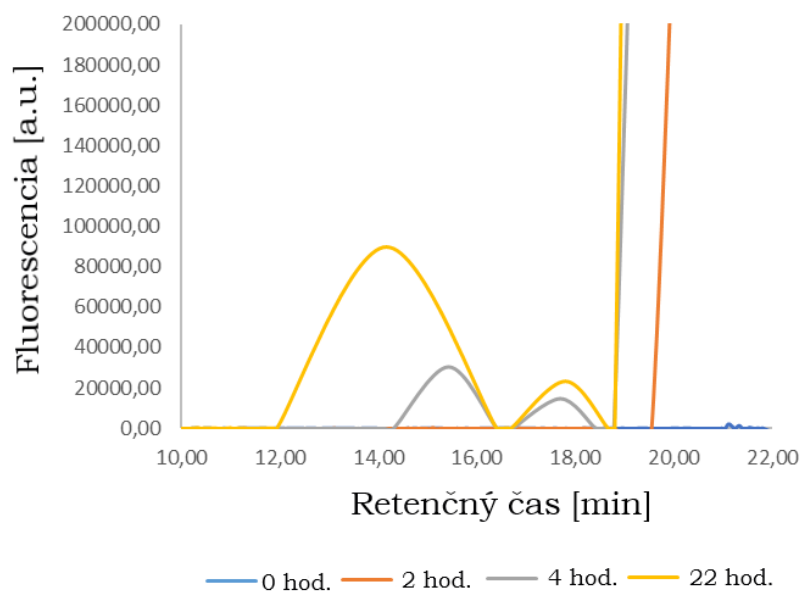
Obrázok 29: Stanovenie produktov transglykozylačnej reakcie Phr1 na TLC platni po vyvíjaní v systéme butanol-etanol-voda (5:3:2)

Vzhľadom na nízku citlivosť metódy využívajúcej TLC bola na stanovenie spôsobu transglykozylačnej aktivity Phr enzýmov využitá kvapalinová chromatografia na kolóne s molekulovým sitom. Táto metóda je založená na sledovaní vzniku fluorescenčne značených produktov v priebehu reakcie a osvedčila sa už pri overovaní účinku inhibítorov na tieto enzýmy. Chromatogramy transglykozylačných reakcií katalyzovaných Phr1 a Phr2 sú znázornené na obrázku č. 30 a 31. Z obrázku č. 30 vyplýva, že činnosťou Phr1 vznikajú primárne menšie produkty. Tento priebeh naznačuje, že donorový substrát sa štiepi blízko neredukujúceho konca a tieto malé fragmenty sú prenášané na značené akceptory. Z obrázku č. 31 vyplýva, že enzým Phr2 je skôr endotransglykozyázou, keďže od počiatku reakcie vznikajú aj produkty s vyššou molekulovou hmotnosťou. Rovnakú metódu využila aj Stratilová et al. pri stanovení transglykozylačnej aktivity rastlinného enzýmu TmXET6.3 (obrázok č. 12) [78]. Enzým XET je tiež typickou endotransglykozyázou, ktorá štiepi donor náhodne.

Pravdepodobným rozdielom medzi Phr2 a TmXET6.3 je výrazná preferencia vysokomolekulárnych donorov rastlinným enzýmom.



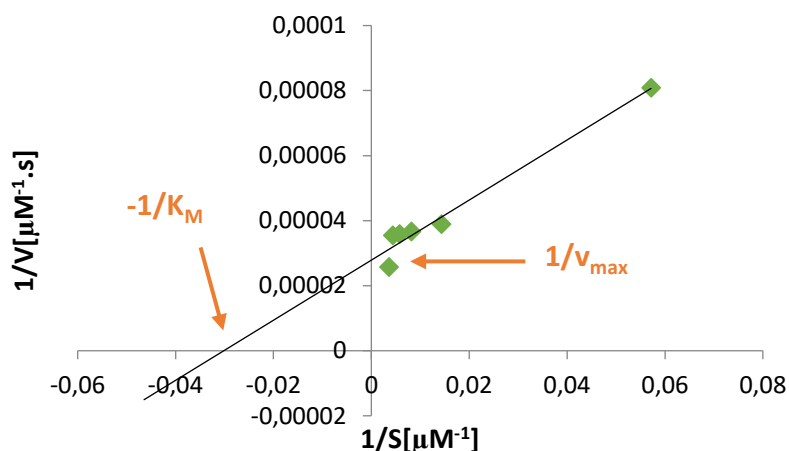
Obrázok 30: Priebeh transglykozylačnej reakcie katalyzovanej enzýmom Phr1 stanovený kvapalinovou chromatografiou s molekulovým sitom. V priebehu reakcie vznikajú fluorescenčne značené produkty vznikajúce inkorporáciou fluorescenčne značeného LaO5-SR do Lam



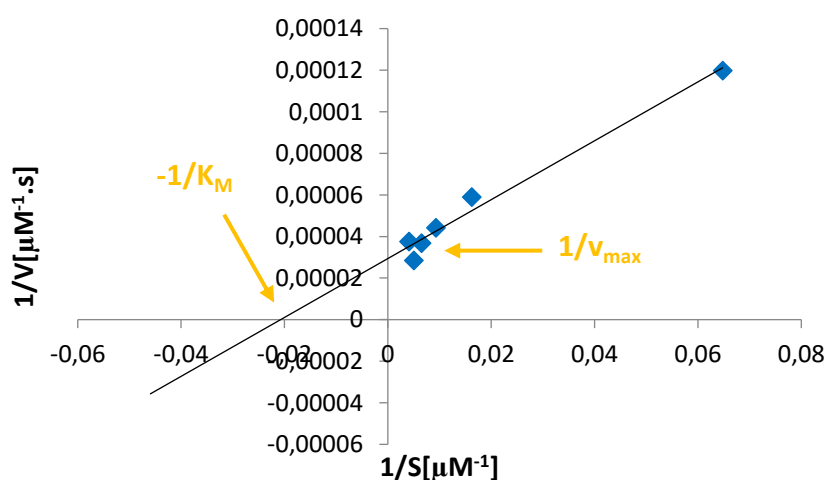
Obrázok 31: Priebeh transglykozylačnej reakcie katalyzovanej enzýmom Phr2 stanovený kvapalinovou chromatografiou s molekulovým sitom. V priebehu reakcie vznikajú fluorescenčne značené produkty vznikajúce inkorporáciou fluorescenčne značeného LaO5-SR do Lam

5.3.5 Vplyv stupňa polymerizácie akceptora na jeho afinitu enzýmom Crh2

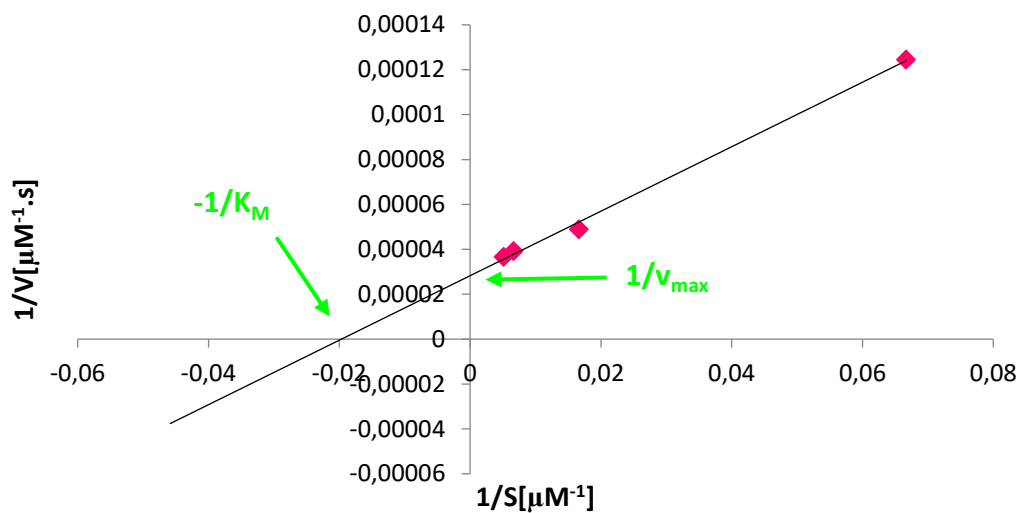
Pre zistenie vplyvu stupňa polymerizácie (DP) akceptora na jeho afinitu s Crh2 sa využívala fluorescenčná „dot-blot“ metóda. Akceptormi transglykozylačnej reakcie boli LaO4, LaO5, LaO6 a donorom bol CM-chitín. Afinitu enzýmu a substrátu vo všeobecnosti vyjadruje Michaelis-Mentenovej konštanta, ktorá bola stanovená pomocou Lineweaver-Burkovej závislosti, ktorej priamka pretína os y v bode $1/v_{\max}$ a os x bode $-1/K_M$, a ktorá je znázornená pre jednotlivé akceptory na obrázkoch č. 32-34.



Obrázok 32: Lineweaver-Burkova závislosť pre akceptor LaO4 (laminaritetraóza)



Obrázok 33: Lineweaver-Burkova závislosť pre akceptor LaO5 (laminaripentaóza)



Obrázok 34: Lineweaver-Burkova závislosť pre akceptor LaO6 (laminarihexaóza)

Výpočtom z Lineweaver-Burkovej závislosti sme získali hodnoty Michaelisových konštánt, ktoré sú znázornené v tabuľke č. 9. Vzhľadom na hodnoty K_M , ktoré boli rádovo rovnaké, je možné usúdiť, že stupeň polymerizácie nemal výrazný vplyv na afinitu enzýmu a substrátu.

Tabuľka 9: Hodnoty K_M pre Crh2 a akceptory s rôznym DP

Enzým	Akceptor	K_M [μM]
Crh2	LaO4	35,7
	LaO5	47,1
	LaO6	50,0

6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium vybraných vlastností kvasinkových transglykozyláz, konkrétne Phr1, Phr2 *C. albicans* a transglykozylázy Crh2 *S. cerevisiae* exprimovaných kmeňmi *P. pastoris*.

Po expresii a purifikácii enzýmov z kultivačného média bol stanovený obsah proteínov vo vzorkách, overená ich čistota SDS-PAGE a pomocou fluorescenčne značeného akceptorového substrátu stanovená ich enzýmová aktivita. Akceptorový substrát bol pripravený v dvoch krokoch, pričom v prvom z nich bol oligosacharid aminovaný a v druhom bol naviazaný sulforodamín, ktorý slúžil ako fluorescenčné značenie. Jeho koncentrácia bola stanovená spektrofotometricky a jeho čistota hmotnostnou spektrometriou. Vzhľadom na rozpor medzi množstvom exprimovaného proteínu a úplnou absenciou enzýmovej aktivity vo vzorke, ktorá mala obsahovať enzým Crh1, sa urobilo tryptické štiepenie proteínov v géli po SDS-PAGE, na základe ktorého sa pomocou hmotnostnej spektrometrie získali ich aminokyselinové sekvencie. Databázové vyhľadávanie umožnilo identifikovať všetky očakávané proteíny s výnimkou Crh1. Na základe toho sa ďalej pracovalo iba s enzýmami Phr1, Phr2 a Crh2.

V prípade enzýmov Phr1 a Phr2 bol stanovený ich spôsob účinku pomocou kvapalinovej chromatografie na molekulovom site. Metóda TLC, opísaná v literatúre, sa pre počiatočné fázy reakcie neosvedčila, vzhľadom na jej nízku citlivosť. Pri pôsobení Phr1 dochádzalo k rozštiepeniu donorového substrátu blízko jeho neredukujúceho konca, čím vznikali malé fragmenty, ktoré boli prenášané na akceptory. Enzým Phr2 účinkoval ako endotransglykozyláza, keďže od počiatku reakcie vznikali aj produkty s vyššou molekulovou hmotnosťou. V rámci štúdia Phr bol tiež sledovaný účinok 67 komerčne dostupných inhibítorov na aktivitu týchto enzýmov. Testovanie malo poskytnúť prvé informácie o štruktúre potenciálnych inhibítorov, ktoré by mohli byť použité pre modelovanie účinnejších foriem. Výsledky skrínungu pomocou fluorescenčnej „dot-blot“ metódy naznačili, že v prípade enzýmu Phr1 by inhibičný účinok mohol vykazovať berberín hydrochlorid a mikonazol nitrát. Vzhľadom na určité obmedzenie použitej metódy bolo potrebné účinok inhibítorov overiť pomocou kvapalinovej chromatografie s molekulovým sitom. Kvantitatívne vyhodnotenie aktivít enzýmu Phr1 bolo založené na meraní nárastu plochy píku produktu v priebehu reakcie. Zistilo sa, že samotné DMSO, v ktorom boli rozpustené všetky inhibítory, znížilo aktivitu Phr1 o 60,21 %. Prídavok potenciálnych inhibítorov aktivitu Phr1 neovplyvnil. Tak isto nemal žiaden z inhibítorov vplyv na aktivitu enzýmu Phr2.

V rámci štúdia enzýmu Crh2 sa sledoval vplyv stupňa polymerizácie (4, 5, 6) akceptora na afinitu s týmto enzýmom. Fluorescenčnou „dot-blot“ metódou sa zistilo, že hodnoty Michaelisovej konštanty boli rádovo rovnaké, čo znamenalo, že stupeň polymerizácie akceptora nemal výrazný vplyv na afinitu enzýmu a substrátu.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] MORATA, Antonio a Iris LOIRA. *Yeast: Industrial Applications*. 1. Croatia: IntechOpen, 2017, s. 3. ISBN 9789535135999.
- [2] FIELDMANN, Horst. *Yeast: Molecular and Cell Biology*. 2. USA: John Wiley, 2011, s. 20-21. ISBN 978-3-527-32609-9.
- [3] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1. Chichester: John Wiley, 1998, s. 29-31. ISBN 9780471964469.
- [4] SCHOTT, Daniel, Tim HUFFAKER a Anthony BRETSCHER. Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 2002, 5(6), 564-574. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00369-7. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527402003697>
- [5] FANTES, Peter a Jean BEGGS. *The Yeast Nucleus*. 1. New York: Oxford University Press, 2000, s. 276. ISBN 9780199637720.
- [6] TADDEI, Angela a Susan M. GASSER. Structure and Function in the Budding Yeast Nucleus. *Genetics*. 2012, 192(1), 108. DOI: 10.1534/genetics.112.140608. ISSN 0016-6731. Dostupné také z: <http://www.genetics.org/lookup/doi/10.1534/genetics.112.140608>
- [7] JORGENSEN, Paul, Nicholas P. EDGINGTON, Brandt L. SCHNEIDER, Ivan RUPEŠ, Mike TYERS, Bruce FUTCHER a Orna COHEN-FIX. The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow. *Molecular Biology of the Cell*. 2007, 18(9), 3523. DOI: 10.1091/mbc.e06-10-0973. ISSN 1059-1524. Dostupné také z: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e06-10-0973>
- [8] SCHEFFLER, Immo E. *Mitochondria*. 1. New York: John Wiley, 2003, s. 22. ISBN 9780471461074.
- [9] HUDECOVÁ, Daniela a Martin ŠIMKOVIČ. *Mikrobiológia*. 1. Bratislava: STU, 2011, s. 86-91. ISBN 978-80-227-3194-2.
- [10] KIRSCH, Donald R., Rosemarie KELLY a Myra B. KURTZ. *The Genetics of Candida*. 1. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1990, s. 2-3. ISBN 9780849355707.
- [11] CALDERONE, Richard A. a Cornelius J. CLANCY. *Candida and candidiasis*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2011, s. 23-24. ISBN 9781555815394.
- [12] CALDERONE, Richard A. a Cornelius J. CLANCY. *Candida and candidiasis*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2011, s. 30-31. ISBN 9781555815394.
- [13] YURIMOTO, Hiroya, Masahide OKU a Yasuyoshi SAKAI. Yeast Methylo-trophy: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis. *International Journal of Microbiology*. 2011, 2011, 1-3. DOI: 10.1155/2011/101298. ISSN 1687-918X. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2011/101298/>

- [14] CREGG, James M. *Pichia Protocols*. 2. USA: Springer Science & Business Media, 2007, s. 1. ISBN 9781588294296.
- [15] DOWNING, A. Kristina. *Protein Nuclear Magnetic Resonance Techniques*. 2. USA: Springer Science & Business Media, 2004, s. 17. ISBN 9781592598090.
- [16] RUSSMAYER, Hannes, Markus BUCHETICS, Clemens GRUBER, et al. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biology*. 2015, 13(1), 19. DOI: 10.1186/s12915-015-0186-5. ISSN 1741-7007. Dostupné také z: <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-015-0186-5>
- [17] RUIZ-HERRERA, José. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. Boca Raton: CRC Press, 1992, s. 8. ISBN 9780849366727.
- [18] ANWAR, M.I., F. MUHAMMAD, M.M. AWAIS a M. AKHTAR. A review of β -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2017, 73(3), 653. DOI: 10.1017/S0043933917000241. ISSN 0043-9339. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1017/S0043933917000241>
- [19] LENARDON, Megan D, Carol A MUNRO a Neil AR GOW. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, 13(4), 416. DOI: 10.1016/j.mib.2010.05.002. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000639>
- [20] KIM, Se-Kwon. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. USA: CRC Press, 2010, s. 25-26. ISBN 9781439816042.
- [21] Chitin: Structure, Function, and Uses. In: *BiologyWise* [online]. Irvine CA: Buzzle.com, 2019 [cit. 2020-01-17]. Dostupné z: <https://biologywise.com/chitin-structure-function-uses>
- [22] DORFMUELLER, Helge C., Andrew T. FERENBACH, Vladimir S. BORODKIN a Daan M. F. VAN AALTEN. A Structural and Biochemical Model of Processive Chitin Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289(33), 23020. DOI: 10.1074/jbc.M114.563353. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.563353>
- [23] MUNRO, Carol A. Chitin and Glucan, the Yin and Yang of the Fungal Cell Wall, Implications for Antifungal Drug Discovery and Therapy. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2013, 2013, 83, 145-146. *Advances in Applied Microbiology*. DOI: 10.1016/B978-0-12-407678-5.00004-0. ISBN 9780124076785. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124076785000040>
- [24] RIEDER, Anne, Simon BALLANCE, Ulrike BÖCKER a Svein KNUTSEN. Quantification of 1,3- β -D-glucan from yeast added as a functional ingredient to bread. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 181, 34. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.09.044. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171731069X>
- [25] ABUAJAH, Christian Izuchukwu. *Functional Components and Medicinal Properties of Food. Sweeteners*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-08-22, 52, 7.

Reference Series in Phytochemistry. DOI: 10.1007/978-3-319-54528-8_39-1. ISBN 978-3-319-26478-3. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54528-8_39-1

[26] PAPASPYRIDIS, Lefki-Maria, Anastasia ZERVA a Evangelos TOPAKAS. Biocatalytic Synthesis of Fungal β -Glucans. *Catalysts*. 2018, 8(7), 3-4. DOI: 10.3390/catal8070274. ISSN 2073-4344. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4344/8/7/274>

[27] FREE, Stephen J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Advances in Genetics*. Elsevier, 2013, 2013, 81, 36. *Advances in Genetics*. DOI: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6. ISBN 9780124076778. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124076778000026>

[28] LIPKE, Peter N. a Rafael OVALLE. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges †. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(15), 3737. DOI: 10.1128/JB.180.15.3736-3737.1998. ISSN 1098-5530. Dostupné také z: <https://JB.asm.org/content/180/15/3735>

[29] BRUL, S., A. KING, J.M. VAN DER VAART, J. CHAPMAN, F. KLIS a C.T. VERRIPS. The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*. Kluwer Academic Publishers, 1997, 3(72), 229.

[30] KLIS, Frans M., Pieternella MOL, Klaas HELLINGWERF a Stanley BRUL. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002, 26(3), 240-243. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>

[31] CAZY Carbohydrate Active Enzymes. *CAZY Carbohydrate Active Enzymes* [online]. Université d'Aix-Marseille: AFMB - CNRS, 1998 [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <http://www.cazy.org/>

[32] VARKI, Ajit, Richard CUMMINGS, Jeffrey ESKO, Hudson FREEZE, Gerald HART a Jamey MARTIN. *Essentials of Glycobiology*. USA: CSHL Press, 1999, s. 255. ISBN 9780879696818.

[33] NAUMOFF, D. G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*. 2011, 76(6), 622-623. DOI: 10.1134/S0006297911060022. ISSN 0006-2979. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297911060022>

[34] FARKAŠ, Vladimír, Kristína VADINOVÁ a Eva STRATILOVÁ. Polysaccharide Transglycosylases: A Survey of Assay Methods. *Journal of Plant Cell Development*. 2018, 1(1), 16.

[35] AO, Jie, Mash'el ALDABBOUS, Marysa J. NOTARO, Mark LOJACONO a Stephen J. FREE. A proteomic and genetic analysis of the *Neurospora crassa* conidia cell wall proteins identifies two glycosyl hydrolases involved in cell wall remodeling. *Fungal Genetics and Biology*. 2016, 94, 5. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.07.003. ISSN 10871845. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184516300755>

- [36] NAWAZ, Muhammad Amjad, Hafiz Mamoon REHMAN, Muhammad IMTIAZ, Faheem Shehzad BALOCH, Jeong Dong LEE, Seung Hwan YANG, Soo In LEE a Gyuhwa CHUNG. Systems Identification and Characterization of Cell Wall Reassembly and Degradation Related Genes in Glycine max (L.) Merrill, a Bioenergy Legume. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), 3. DOI: 10.1038/s41598-017-11495-4. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-11495-4>
- [37] THOMPSON, Andrew J., Gaetano SPECIALE, Javier IGLESIAS-FERNÁNDEZ, et al. Evidence for a Boat Conformation at the Transition State of GH76 α -1,6-Mannanases-Key Enzymes in Bacterial and Fungal Mannoprotein Metabolism. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015, 54(18), 5378. DOI: 10.1002/anie.201410502. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201410502>
- [38] BLANCO, Noelia, Ana B. SANZ, Jose M. RODRÍGUEZ-PEÑA, César NOMBELA, Vladimír FARKAŠ, Ramón HURTADO-GUERRERO a Javier ARROYO. Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases. *The FEBS Journal*. 2015, 282(4), 716. DOI: 10.1111/febs.13176. ISSN 1742464X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13176>
- [39] MAZÁŇ, Marian, Noelia BLANCO, Kristína KOVÁČOVÁ, Zuzana FIRÁKOVÁ, Pavel ŘEHULKA, Vladimír FARKAŠ a Javier ARROYO. A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical Journal*. 2013, 455(3), 307-318. DOI: 10.1042/BJ20130354. ISSN 0264-6021. Dostupné také z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/455/3/307/46244/A-novel-fluorescence-assay-and-catalytic>
- [40] PARDINI, Giacomo, Piet W. J. DE GROOT, Alix T. COSTE, Mahir KARABABA, Frans M. KLIS, Chris G. DE KOSTER a Dominique SANGULARD. The CRH Family Coding for Cell Wall Glycosylphosphatidylinositol Proteins with a Predicted Transglycosidase Domain Affects Cell Wall Organization and Virulence of Candida albicans. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281(52), 40400. DOI: 10.1074/jbc.M606361200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M606361200>
- [41] YANG, Qing a Tamo FUKAMIZO. *Targeting Chitin-containing Organisms: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer, 2019, s. 30. ISBN 9789811373183.
- [42] P53301 (CRH1_YEAST). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P53301>
- [43] P32623 (CRH2_YEAST). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P32623>
- [44] MILLET, Nicolas, Jean-Paul LATGÉ a Isabelle MOUZYNA. Members of Glycosyl-Hydrolase Family 17 of A. fumigatus Differentially Affect Morphogenesis. *Journal of Fungi*. 2018, 4(1), 1-2. DOI: 10.3390/jof4010018. ISSN 2309-608X. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/18>

- [45] MARTÍNEZ-NÚÑEZ, Leonora a Meritxell RIQUELME. Role of BGT-1 and BGT-2, two predicted GPI-anchored glycoside hydrolases/glycosyltransferases, in cell wall remodeling in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 2015, 85, 68. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.11.001. ISSN 10871845. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184515300426>
- [46] JUNGES, Ângela, Juliano Tomazzoni BOLDO, Bárbara Kunzler SOUZA, et al. Genomic Analyses and Transcriptional Profiles of the Glycoside Hydrolase Family 18 Genes of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *PLoS ONE*. 2014, 9(9), 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0107864. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0107864>
- [47] YANG, Qing a Tamo FUKAMIZO. *Targeting Chitin-containing Organisms: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer, 2019, s. 224. ISBN 9789811373183.
- [48] HUANG, Qian-Sheng, Xiao-Lan XIE, Ge LIANG, et al. The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology*. 2012, 22(1), 23-24. DOI: 10.1093/glycob/cwr092. ISSN 1460-2423. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwr092>
- [49] KARLSSON, Magnus a Jan STENLID. Comparative Evolutionary Histories of the Fungal Chitinase Gene Family Reveal Non-Random Size Expansions and Contractions due to Adaptive Natural Selection. *Evolutionary Bioinformatics*. 2008, 4, 49. DOI: 10.4137/EBO.S604. ISSN 1176-9343. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/EBO.S604>
- [50] AO, Jie a Stephen J. FREE, 2017. Genetic and biochemical characterization of the GH72 family of cell wall transglycosylases in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 101, 46-54. DOI: 10.1016/j.fgb.2017.03.002. ISSN 10871845. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184517300361>
- [51] HURTADO-GUERRERO, Ramon, Alexander W. SCHÜTTELKOPF, Isabelle MOUYNA, Adel F. M. IBRAHIM, Sharon SHEPHERD, Thierry FONTAINE, Jean-Paul LATGÉ a Daan M. F. VAN AALTEN, 2009. Molecular Mechanisms of Yeast Cell Wall Glucan Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 284(13), 8461-8462. DOI: 10.1074/jbc.M807990200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M807990200>
- [52] DEGANI, Genny, Enrico RAGNI, Pedro BOTIAS, et al., 2016. Genomic and functional analyses unveil the response to hyphal wall stress in *Candida albicans* cells lacking $\beta(1,3)$ -glucan remodeling. *BMC Genomics*. 17(1), 1-3. DOI: 10.1186/s12864-016-2853-5. ISSN 1471-2164. Dostupné také z: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2853-5>
- [53] CALDERON, Julia, Martin ZAVREL, Enrico RAGNI, William A. FONZI, Steffen RUPP a Laura POPOLO, 2010. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. *Microbiology*. 156(8),

2485. DOI: 10.1099/mic.0.038000-0. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.038000-0>
- [54] POPOLO, Laura, Genny DEGANI, Carlo CAMILLONI a William FONZI. The PHR Family: The Role of Extracellular Transglycosylases in Shaping *Candida albicans* Cells. *Journal of Fungi*. 2017, 3(4), 3. DOI: 10.3390/jof3040059. ISSN 2309-608X. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/59>
- [55] P43076 (PHR1_CANAL). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P43076?csm=0836AD1428C5769A>
- [56] O13318 (PHR2_CANAL). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/O13318>
- [57] HOFFMEISTER, Dirk a Karl ESSER. *Biochemistry and Molecular Biology: The Mycota*. 3rd. ed. London: Springer, 2016, s. 154. ISBN 9783319277905.
- [58] KAR, Bibekananda, Pavan PATEL, Jie AO a Stephen J. FREE. Neurospora crassa family GH72 glucanotransferases function to crosslink cell wall glycoprotein N-linked galactomannan to cell wall lichenin. *Fungal Genetics and Biology*. 2019, 123, 67-67. DOI: 10.1016/j.fgb.2018.11.007. ISSN 10871845. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184518301725>
- [59] P36091 (DCW1_YEAST). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2020 [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P36091>
- [60] Q05031 (DFG5_YEAST). In: *SWISS-MODEL* [online]. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q05031>
- [61] KIRBY, Anthony J. a Florian HOLLFELDER. *From enzyme models to model enzymes*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009, s. 134. ISBN 9780854041756.
- [62] VUONG, Thu V. a David B. WILSON. Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 107(2), 196. DOI: 10.1002/bit.22838. ISSN 00063592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22838>
- [63] OKUYAMA, Masayuki. Function and Structure Studies of GH Family 31 and 97 α -Glycosidases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, 75(12), 2271. DOI: 10.1271/bbb.110610. ISSN 0916-8451. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.110610>
- [64] KETUDAT CAIRNS, James R. a Asim ESEN. B-Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010, 67(20), 3400. DOI: 10.1007/s00018-010-0399-2. ISSN 1420-682X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0399-2>
- [65] STICK, Robert V. a Spencer WILLIAMS. *Carbohydrates: the essential molecules of life*. Second edition. Amsterdam: Elsevier, 2009, s. 255. ISBN 9780080927022.

- [66] TRAMICE, Annabella, Giuseppina ANDREOTTI, Assunta GIORDANO a Antonio TRINCONE. Enzymatic Transglycosylation. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. 2010, 2009-10-16, 3, 3-4. DOI: 10.1002/9780470054581.eib273.
- [67] GRUNWALD, Peter. *Handbook of Carbohydrate-Modifying Biocatalysts*. 2. USA: CRC Press, 2016, s. 1056. ISBN 9781351733977.
- [68] DAVIES, Gideon a Bernard HENRISSAT. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995, 3(9), 853. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9. ISSN 09692126. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212601002209>
- [69] FRY, S C, R C SMITH, K F RENWICK, D J MARTIN, S K HODGE a K J MATTHEWS. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal*. 1992, 282(3), 821-828. DOI: 10.1042/bj2820821. ISSN 0264-6021. Dostupné také z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/282/3/821/27764/Xyloglucan-endotransglycosylase-a-new>
- [70] FARKAS, Vladimir, Zdena SULOVA, Eva STRATILOVA, Rami HANNA a Gordon MACLACHLAN. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992, 298(2), 365-370. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90423-T. ISSN 00039861. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398619290423T>
- [71] PAVELKA, Stanislav. Radiometric enzyme assays: development of methods for extremely sensitive determination of types 1, 2 and 3 iodothyronine deiodinase enzyme activities. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2010, 286(3), 861. DOI: 10.1007/s10967-010-0798-8. ISSN 0236-5731. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10967-010-0798-8>
- [72] FRY, Stephen C. Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *The Plant Journal*. 1997, 11(5), 114. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x. ISSN 0960-7412. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x>
- [73] MAZÁŇ, Marián, Enrico RAGNI, Laura POPOLO a Vladimír FARKAŠ. Catalytic properties of the Gas family β -(1,3)-glucanotransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochemical Journal*. 2011, 438(2), 275-282. DOI: 10.1042/BJ20110405. ISSN 0264-6021. Dostupné také z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/438/2/275/45645/Catalytic-properties-of-the-Gas-family>
- [74] ZHAO, Liming. *Oligosaccharides of Chitin and Chitosan: Bio-manufacture and Applications*. Singapore: Springer Nature, 2019, s. 95. ISBN 9789811394027.
- [75] BLANCHART, Bart, Erwin ADAMS a Ann VAN SCHEPDAEL. An overview of analytical methods for monitoring bacterial transglycosylation. *Anal. Methods*. 2014, 6(19), 7593. DOI: 10.1039/C4AY01299B. ISSN 1759-9660. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AY01299B>

- [76] SCHRÖDER, Roswitha, Teresa F. WĘGRZYN, Karen M. BOLITHO a Robert J. REDGWELL. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta*. 2004, 219(4), 592. DOI: 10.1007/s00425-004-1274-x. ISSN 0032-0935. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-004-1274-x>
- [77] KOVÁČOVÁ, Kristína, Genny DEGANI, Eva STRATILOVÁ, Vladimír FARKAŠ a Laura POPOLO. Catalytic properties of Phr family members of cell wall glucan remodeling enzymes: implications for the adaptation of *Candida albicans* to ambient pH. *FEMS Yeast Research*. 2015, 15(2), 10. DOI: 10.1093/femsyr/fou011. ISSN 1567-1356. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/fou011/535972/Catalytic-properties-of-Phr-family-members-of-cell>
- [78] STRATILOVÁ, Barbora, Zuzana FIRÁKOVÁ, Jaroslav KLAUDINY, et al. Engineering the acceptor substrate specificity in the xyloglucan endotransglycosylase TmXET6.3 from nasturtium seeds (*Tropaeolum majus* L.). *Plant Molecular Biology*. 2019, 100(1-2), 190. DOI: 10.1007/s11103-019-00852-8. ISSN 0167-4412. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11103-019-00852-8>
- [79] SELLERBERG, Monika, Diego DI BARTOLO, Julia OBERRECHT, Jörg TILLER a Peter WALZEL. Viscometric Measurement of Protease Activities on Gelatine Substrate. *Applied Rheology*. 2014, 24(6), 2. DOI: 10.3933/ApplRheol-24-62660.
- [80] SULOVA, Z., M. LEDNICKA a V. FARKAS. A Colorimetric Assay for Xyloglucan-Endotransglycosylase from Germinating Seeds. *Analytical Biochemistry*. 1995, 229(1), 80-85. DOI: 10.1006/abio.1995.1381. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269785713814>
- [81] RICHARDSON, M. D. a D. W. WARNOCK. *Fungal infection: diagnosis and management*. 4th ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012, s. 3. ISBN 978-1-4051-7056-7.
- [82] BROWN, Gordon D. a Mihai G. NETEA. *Immunology of Fungal Infections*. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2007, s. 178. ISBN 9781402054921.
- [83] Could A Yeast Infection Be An Early Sign Of This Common Disease? In: <https://www.prevention.com> [online]. Harlan: Hearst Magazine Media, 2017 [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <https://www.prevention.com/health/a20502974/symptom-of-high-blood-sugar/>
- [84] HERNANDEZ, Hazael, Victor H. ERIVES a Luis R. MARTINEZ. Coccidioidomycosis: Epidemiology, Fungal Pathogenesis, and Therapeutic Development. *Current Tropical Medicine Reports*. 2019, 6(3), 132-134. DOI: 10.1007/s40475-019-00184-z. ISSN 2196-3045. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s40475-019-00184-z>
- [85] MAYER, François L. a James W. KRONSTAD. *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*. 2020, 28(2), 163. DOI: 10.1016/j.tim.2019.10.003. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X19302586>
- [86] BERGER, Dr. Stephen. *Histoplasmosis: Global Status* [online]. Los Angeles: GIDEON Informatics, 2020 [cit. 2020-01-20]. ISBN 978-1-4988-2861-1. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=WP3VDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- [87] EKENG, B. E., O. O. OLUSOGA a R. O. OLADELE. AIDS-Related Mycoses in the Paediatric Population. *Current Fungal Infection Reports*. 2019, 13(4), 224-225. DOI: 10.1007/s12281-019-00352-8. ISSN 1936-3761. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12281-019-00352-8>
- [88] MILLER, Rachel a Maha ASSI. Endemic fungal infections in solid organ transplant recipients—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*. 2019, 33(9), 2. DOI: 10.1111/ctr.13553. ISSN 0902-0063. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ctr.13553>
- [89] VAN DYKE, Marley C Caballero, Marcus M TEIXEIRA a Bridget M BARKER, 2019. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 52, 57. DOI: 10.1016/j.mib.2019.05.002. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952741930013X>
- [90] FERNANDES, Prabhavathi B. *New Approaches for Antifungal Drugs*. New York: Springer Science & Business Media, 2013, s. 7. ISBN 9781489967299.
- [91] BONDARYK, Małgorzata, Monika STANISZEWSKA, Paulina ZIELIŃSKA a Zofia URBAŃCZYK-LIPKOWSKA. Natural Antimicrobial Peptides as Inspiration for Design of a New Generation Antifungal Compounds. *Journal of Fungi*. 2017, 3(3), 4-5. DOI: 10.3390/jof3030046. ISSN 2309-608X. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/3/46>
- [92] VERMES, A. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, 46(2), 172. DOI: 10.1093/jac/46.2.171. ISSN 14602091. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/46.2.171>
- [93] GHANNOUM, Mahmoud A. a Louis B. RICE. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, 12(4), 504. DOI: 10.1128/CMR.12.4.501. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.12.4.501>
- [94] ALI MALAYERI, Fardin, Aliakbar REZAEI a Omid RAIESI. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2018, 5(2), 49. DOI: 10.29252/jbrms.5.2.48. ISSN 2383-0506. Dostupné také z: <http://jbrms.medilam.ac.ir/article-1-362-en.html>
- [95] BASAK, Amit, Ranadhir CHAKRABORTY a Santi M. MANDAL, ed. *Recent Trends in Antifungal Agents and Antifungal Therapy*. India: Springer, 2016, s. 178. ISBN 9788132227823.
- [96] GHANNOUM, Mahmoud a John R. PERFECT. *Antifungal Therapy*. Boca Raton: CRC Press, 2016, s. 219. ISBN 9780849387869.
- [97] FEJERSKOV, Ole a Edwina KIDD. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. 2. Oxford: John Wiley, 2009, s. 274. ISBN 9781444309287.

- [98] TAN, Wen, Yingbo LI, Meiwan CHEN a Yitao WANG. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 1173. DOI: 10.2147/IJN.S22683. ISSN 1178-2013. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/berberine-hydrochloride-anticancer-activity-and-nanoparticulate-delive-peer-reviewed-article-IJN>
- [99] SONG, Yu'ning, Hao XU, Wenmin CHEN, Peng ZHAN a Xinyong LIU. 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *MedChemComm*. 2015, 6(1), 61. DOI: 10.1039/C4MD00284A. ISSN 2040-2503. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4MD00284A>
- [100] KINTZ, P., C. JAMEY, S. DORAY a B. LUDES. Acute fatal poisoning with dichlorophen. *International Journal of Legal Medicine*. 1997, 110(2), 95. DOI: 10.1007/s004140050039. ISSN 0937-9827. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s004140050039>
- [101] RIGOPOULOS, Dimitris, Boni ELEWSKI a Bertrand RICHERT. *Onychomycosis: Diagnosis and Effective Management*. Oxford: John Wiley, 2018, s. 106. ISBN 9781119226505.
- [102] GRAYSON, M. Lindsay, Suzanne M. CROWE, James S. MCCARTHY, John MILLS, Johan W. MOUTON, S. Ragnar NORRBY, David L. PATERSON a Michael A. PFALLER. *Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*. Boca Raton: CRC Press, 2010, s. 159. ISBN 9781444147520.
- [103] SCHAEFER, Christof. *Drugs During Pregnancy and Lactation: Handbook of Prescription Drugs and Comparative Risk Assessment*. Amsterdam: Elsevier Science, 2001, s. 66. ISBN 9780444507631.
- [104] MALEY, Alexander M. a Jack L. ARBISER. Gentian Violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Experimental Dermatology*. 2013, 22(12), 775. DOI: 10.1111/exd.12257. ISSN 09066705. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.12257>
- [105] REEDER, Nancy L., Jerry KAPLAN, Jun XU, et al. Zinc Pyrithione Inhibits Yeast Growth through Copper Influx and Inactivation of Iron-Sulfur Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011, 55(12), 5753. DOI: 10.1128/AAC.00724-11. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00724-11>
- [106] CROWLEY, P.D. a H.C. GALLAGHER. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*. 2014, 117(3), 611. DOI: 10.1111/jam.12554. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12554>
- [107] FINCH, Roger G., David GREENWOOD, Richard J. WHITLEY a S. Ragnar NORRBY, ed. *Antibiotic and Chemotherapy* [online]. 9. China: Elsevier Health Sciences, 2010 [cit. 2020-02-29]. ISBN 9780702047657. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=DE4Mxc3aesEC&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- [108] GAGLIARDI, L., G. CAVAZZUTTI a D. TONELLI. Determination of Dequalinium Chloride and Related Impurities in Cosmetics And Pharmaceuticals by Reversed-Phase HPLC. *Analytical Letters*. 1998, 31(5), 831-832. DOI: 10.1080/00032719808002821. ISSN 0003-2719. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719808002821>
- [109] BARONE, Joseph A., Bruce L. MOSKOVITZ, Joseph GUARNIERI, Alan E. HASSELL, John L. COLAIZZI, Robert H. BIERMAN a Lois JESSEN. Enhanced Bioavailability of Itraconazole in Hydroxypropyl β -Cyclodextrin Solution versus Capsules in Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998, 42(7), 1862. DOI: 10.1128/AAC.42.7.1862. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.42.7.1862>
- [110] MARTIN, Michael V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999, 44(4), 429. DOI: 10.1093/jac/44.4.429. ISSN 1460-2091. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/44.4.429>
- [111] MESA-ARANGO, Ana C., Liliana SCORZONI a Oscar ZARAGOZA. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3, 1. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00286. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00286/abstract>
- [112] Sonali Gire, P.A. Datar ., R.V. Shete . a Vrushali Harnaskar . Analysis of Tolnaftate - Review. *Journal of Current Pharma Research*. 2018, 8(2), 2347. DOI: 10.33786/JCPR.2018.v08i02.006. ISSN 22307834. Dostupné také z: <http://e-currentscience.com/storage/app/archive/pdf/IJcS8KsK4rFXAn1oTI1lvgDMFGRpTHnuYqNP0FXI.pdf>
- [113] GUPTA, Aditya K. Ciclopirox: an overview. *International Journal of Dermatology*. 2001, 40(5), 305. DOI: 10.1046/j.1365-4362.2001.01156.x. ISSN 0011-9059. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-4362.2001.01156.x>
- [114] LI, Runan, Xinglu PAN, Yan TAO, et al. Systematic Evaluation of Chiral Fungicide Imazalil and Its Major Metabolite R14821 (Imazalil-M): Stability of Enantiomers, Enantioselective Bioactivity, Aquatic Toxicity, and Dissipation in Greenhouse Vegetables and Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67(41), 11331. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03848. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b03848>
- [115] SIEGEL, M. R., A. KERKENAAR a A. Kaars SIJPESTEIJN. Antifungal activity of the systemic fungicide imazalil. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1977, 83(S1), 121. DOI: 10.1007/BF03041427. ISSN 0028-2944. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03041427>
- [116] GADAD, AP, AmolPrakash MAGDUM, PM DANDAGI, UB BOLMAL a Shirraj KAMAT. Formulation and characterization of oxiconazole-loaded emulgel for topical application. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research (KLEU)*.

2017, 10(3), 303. DOI: 10.4103/kleuhsj.ijhs_259_16. ISSN 2542-6214. Dostupné také z: <http://www.ijournalhs.org/text.asp?2017/10/3/303/213995>

[117] WEATHERLY, Lisa M. a Julie A. GOSSE. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2017, 20(8), 447. DOI: 10.1080/10937404.2017.1399306. ISSN 1093-7404. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2017.1399306>

[118] LACKNER, Thomas E. a Stephen P. CLISSOLD. Bifonazole. *Drugs*. 1989, 38(2), 204-225. DOI: 10.2165/00003495-198938020-00004. ISSN 0012-6667. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-198938020-00004>

[119] ARIKA, Tadashi, Mamoru YOKOO, Toyoji HASE, Tetsuya MAEDA, Kouji AMEMIYA a Hideyo YAMAGUCHI. Effects of butenafine hydrochloride, a new benzylamine derivative, on experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990, 34(11), 2250. DOI: 10.1128/AAC.34.11.2250. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.34.11.2250>

[120] CANO, Arturo, María Teresa RAMÍREZ-APAN a Guillermo DELGADO. Biotransformation of sclareolide by filamentous fungi: cytotoxic evaluations of the derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011, 22(6), 1178. DOI: 10.1590/S0103-50532011000600025. ISSN 0103-5053.

[121] GUPTA, Ramwant a S K CHAKRABARTY. Gibberellic acid in plant. *Plant signaling & behavior*. 2014, 8(9), 1. DOI: 10.4161/psb.25504. ISSN 1559-2324. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.25504>

[122] DO COUTO, Fabíola Maria Marques, Silene Carneiro DO NASCIMENTO, Silvio Francisco Pereira JÚNIOR, Vanessa Karina Alves DA SILVA, André Ferraz Goiana LEAL a Rejane Pereira NEVES. Antifungal activity of the piroctone olamine in experimental intra-abdominal candidiasis. *SpringerPlus*. 2016, 5(1), 1. DOI: 10.1186/s40064-016-2130-8. ISSN 2193-1801. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2130-8>

[123] WELSCHER, Yvonne M. te, Hendrik H. ten NAPEL, Miriam Masià BALAGUÉ, Cleiton M. SOUZA, Howard RIEZMAN, Ben DE KRUIJFF a Eefjan BREUKINK. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283(10), 6393. DOI: 10.1074/jbc.M707821200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M707821200>

[124] CASTINETTI, Frederic, Laurence GUIGNAT, Pauline GIRAUD, et al. Ketoconazole in Cushing's Disease: Is It Worth a Try? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014, 99(5), 1624. DOI: 10.1210/jc.2013-3628. ISSN 0021-972X. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jcem/article/99/5/1623/2537349>

- [125] TONOMURA, K., K. MAEDA, F. FUTAI, T. NAKAGAMI a M. YAMADA. Stimulative Vaporization of Phenyl-mercuric Acetate by Mercury-resistant Bacteria. *Nature*. 1968, 217(5129), 644. DOI: 10.1038/217644b0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/217644b0>
- [126] KRÁTKÝ, Martin a Jarmila VINŠOVÁ. Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid. *Molecules*. 2012, 17(8), 9427. DOI: 10.3390/molecules17089426. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/8/9426>
- [127] MOSCOU, Kathy a Karen SNIPE. *Pharmacology for Pharmacy Technicians*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2012, s. 709. ISBN 9780323085786.
- [128] BAREGGI, Silvio R. a Umberto CORNELLI. Clioquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2012, 18(1), 41. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00231.x. ISSN 17555930. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-5949.2010.00231.x>
- [129] DING, Wei-Qun, Bolin LIU, Joshua L. VAUGHT, Hanako YAMAUCHI a Stuart E. LIND. Anticancer Activity of the Antibiotic Clioquinol. *Cancer Research*. 2005, 65(8), 3389. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3577. ISSN 0008-5472. Dostupné také z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-3577>
- [130] YOST, Lisa J., Joseph D. RODRICKS, Duncan TURNBULL, Paul C. DELEO, J. Frank NASH, Antonio QUIÑONES-RIVERA a Pete A. CARLSON. Human health risk assessment of chloroxylenol in liquid hand soap and dishwashing soap used by consumers and health-care professionals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016, 80, 116. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.06.003. ISSN 02732300. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230016301611>
- [131] JAYAVEERA, K. N., S. SUBRAMANYAM a K. Yogananda REDYY. *Practical Medicinal Chemistry*. New Delhi: S. Chand Publishing, 2014, s. 72. ISBN 9788121942454.
- [132] ARIF, Tasleem. Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2015, (8), 456. DOI: 10.2147/CCID.S84765. ISSN 1178-7015. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/salicylic-acid-as-a-peeling-agent-a-comprehensive-review-peer-reviewed-article-CCID>
- [133] RANAWARE, Abhishek, Kishore BANIK, Vishwas DESHPANDE, et al. Magnolol: A Neolignan from the Magnolia Family for the Prevention and Treatment of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(8), 2. DOI: 10.3390/ijms19082362. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2362>
- [134] BORTOLIN, Monica, Alessandro BIDOSSI, Elena DE VECCHI, Maura AVVENIENTE a Lorenzo DRAGO. In vitro Antimicrobial Activity of Chlorquinaldol against Microorganisms Responsible for Skin and Soft Tissue Infections: Comparative Evaluation

with Gentamicin and Fusidic Acid. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8, 2. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01039. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01039/full>

[135] DUMANCAS, G.G., R.S. HIKKADUWA KORALEGE, E.-R.E. MOJICA, B.S. MURDIANTI a P.J. PHAM. Thiabendazole. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, 2014, (3), 533. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.01173-8. ISBN 9780123864550. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543011738>

[136] BECKER, Lillian C., Wilma F. BERGFELD, Donald V. BELSITO, Ronald A. HILL, Curtis D. KLAASSEN a Daniel C. LIEBLER. Safety Assessment of Tromethamine, Aminomethyl Propanediol, and Aminoethyl Propanediol as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2018, 37(1_suppl), 75. DOI: 10.1177/1091581817738242. ISSN 1091-5818. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581817738242>

[137] VINCENT-BALLEREAU, Françoise N., Olivier N. PATEY a Christian LAFAIX. Fluconazole. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. 1991, 13(2), 45. DOI: 10.1007/BF01974981. ISSN 0167-6555. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01974981>

[138] PAZ-ALVAREZ, Miguel, Paul D.A. PUDNEY, Jonathan HADGRAFT a Majella E. LANE. Topical delivery of climbazole to mammalian skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018, 549(1-2), 317-318. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.058. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517318305337>

[139] KANAKAPURA, Basavaiah a Vamsi Krishna PENMATSA. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, 6(3), 137-138. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.01.003. ISSN 20951779. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S209517791630003X>

[140] SINGH, Rajbir. *Synthetic Drugs*. New Delhi: Mittal Publications, 2002, s. 359. ISBN 9788170998310.

[141] HALL, Gerri S. *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance*. New York: Springer Science & Business Media, 2011, s. 48. ISBN 9781597451345.

[142] BOHN, Manfred a Karl Th. KRAEMER. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000, 43(4), 58. DOI: 10.1067/mjd.2000.109072. ISSN 01909622. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962200047472>

[143] TOGNI, Giuseppe, Valeria BATTINI, Anna BULGHERONI, Federico MAILLAND, Maurizio CASERINI a Werner MENDLING. In Vitro Activity of Nifuratel on Vaginal Bacteria: Could It Be a Good Candidate for the Treatment of Bacterial Vaginosis?: Could It Be a Good Candidate for the Treatment of Bacterial Vaginosis? *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy. 2011, 55(5), 2490. DOI: 10.1128/AAC.01623-10. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01623-10>

[144] JOHNSON, Elizabeth M., Joshua O. OJWANG, Adrien SZEKELY, Thomas L. WALLACE a David W. WARNOCK. Comparison of In Vitro Antifungal Activities of Free and Liposome-Encapsulated Nystatin with Those of Four Amphotericin B Formulations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998, 42(6), 1412. DOI: 10.1128/AAC.42.6.1412. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.42.6.1412>

[145] KHANNA, Deepshikha a Subhash BHARTI. Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review. *Core Evidence*. 2014, 9, 113. DOI: 10.2147/CE.S49629. ISSN 1555-175X. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/luliconazole-for-the-treatment-of-fungal-infections-an-evidence-based-peer-reviewed-article-CE>

[146] TUCKER, Samuel P., Barry R. BELINKY, Teresa A. SEITZ a G. David FOLEY. DETERMINATION OF PENTAMIDINE ISETHIONATE IN AIR. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 2010, 54(10), 628-632. DOI: 10.1080/15298669391355143. ISSN 0002-8894. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15298669391355143>

[147] JENKS, Jeffrey D, Helmut JF SALZER, Juergen PRATTES, Robert KRAUSE, Dieter BUCHHEIDT a Martin HOENIGL. Spotlight on isavuconazole in the treatment of invasive aspergillosis and mucormycosis: design, development, and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018, 12. DOI: 10.2147/DDDT.S145545. ISSN 1177-8881. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/spotlight-on-isavuconazole-in-the-treatment-of-invasive-aspergillosis-peer-reviewed-article-DDDT>

[148] LIPNER, Shari a Richard SCHER. Efinaconazole in the treatment of onychomycosis. *Infection and Drug Resistance*. 2015, (8), 164. DOI: 10.2147/IDR.S69596. ISSN 1178-6973. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/efinaconazole-in-the-treatment-of-onychomycosis-peer-reviewed-article-IDR>

[149] SINGH, Simranjeet, Nasib SINGH, Vijay KUMAR, Shivika DATTA, Abdul Basit WANI, Damnita SINGH, Karan SINGH a Joginder SINGH. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*. 2016, 14(3), 317. DOI: 10.1007/s10311-016-0566-2. ISSN 1610-3653. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-016-0566-2>

[150] TERPOU, Antonia, Maria DIMOPOULOU, Aikaterini BELKA, Stamatina KALLITHRAKA, George-John E. NYCHAS a Seraphim PAPANIKOLAOU. Effect of Myclobutanil Pesticide on the Physiological Behavior of Two Newly Isolated *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Very-High-Gravity Alcoholic Fermentation. *Microorganisms*. 2019, 7(12), 3. DOI: 10.3390/microorganisms7120666. ISSN 2076-2607. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/12/666>

- [151] GAJRA, Balaram, Saurabh S. PANDYA, Sanjay SINGH a Haribhai A. RABARI. Mucoadhesive Hydrogel Films of Econazole Nitrate: Formulation and Optimization Using Factorial Design. *Journal of Drug Delivery*. 2014, 2014, 1-2. DOI: 10.1155/2014/305863. ISSN 2090-3014. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2014/305863/>
- [152] BASAVAIHAH, Kanakapura, Hullikal PRAMEELA a Bankavadi SOMASHEKAR. Spectrophotometric determination of pefloxacin mesylate in pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica*. 2007, 57(2), 221. DOI: 10.2478/v10007-007-0018-4. ISSN 1846-9558. Dostupné také z: <http://content.sciendo.com/view/journals/acph/57/2/article-p221.xml>
- [153] SCOTT, Lesley J a Dene SIMPSON. Voriconazole. *Drugs*. 2007, 67(2), 269. DOI: 10.2165/00003495-200767020-00009. ISSN 0012-6667. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200767020-00009>
- [154] BOROVINSKAYA, M. A., S. SHOJI, K. FREDRICK a J. H.D. CATE. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*. 2008, 14(8), 1590-1599. DOI: 10.1261/rna.1076908. ISSN 1355-8382. Dostupné také z: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.1076908>
- [155] IKEDA, Fumiaki. Antifungal activity and clinical efficacy of micafungin sodium (Funguard). *Folia Pharmacologica Japonica*. 2003, 122(4), 339. DOI: 10.1254/fpj.122.339. ISSN 0015-5691. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/fpj/122.339?from=CrossRef>
- [156] MISHRA, Bibaswan, Sunit Kumar SAHOO a Susijit SAHOO. Liranaftate loaded Xanthan gum based hydrogel for topical delivery: Physical properties and ex-vivo permeability. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 1717. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.039. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017332415>
- [157] MCCORMACK, Paul L a Caroline M PERRY. Caspofungin. *Drugs*. 2005, 65(14), 2049. DOI: 10.2165/00003495-200565140-00009. ISSN 0012-6667. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200565140-00009>
- [158] RIESKE, John S. Antimycin A. *Mechanism of Action*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1967, 1967, 1, 542. DOI: 10.1007/978-3-642-46051-7_42. ISBN 978-3-642-46053-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-46051-7_42
- [159] KOSÍK, Ondřej a Vladimír FARKAŠ. One-pot fluorescent labeling of xyloglucan oligosaccharides with sulforhodamine. *Analytical Biochemistry*. 2008, 375(2), 232-236. DOI: 10.1016/j.ab.2007.11.025. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269707007737>
- [160] CABIB, Enrico, Vladimir FARKAS, Ondrej KOSÍK, Noelia BLANCO, Javier ARROYO a Peter MCPHIE. Assembly of the Yeast Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*.

2008, 283(44), 29859-29872. DOI: 10.1074/jbc.M804274200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M804274200>

[161] LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259), 680-685. DOI: 10.1038/227680a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/227680a0>

[162] SHEVCHENKO, Andrej, Henrik TOMAS, Jan HAVLI, Jesper V OLSEN a Matthias MANN. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006, 1(6), 2856-2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468. ISSN 1754-2189. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.468>

[163] FRANC, Vojtěch, Marek ŠEBELA, Pavel ŘEHULKA, Radka KONČITÍKOVÁ, René LENOBEL, Catherine MADZAK a David KOPEČNÝ. Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics*. 2012, 75(13), 4027-4037. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.05.013. ISSN 18743919. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391912003016>

[164] HORVÁTHOVÁ, Ágnes, Barbora STRATILOVÁ, Vladimír FARKAŠ a Eva STRATILOVÁ. *Testovanie inhibičného účinku komerčných antifungálnych látok na enzým xyloglukánendotransglykozyláza (XET)*. Bratislava: ŠVK PriF UK, 2019. ISBN 978-80-223-4711-2.

[165] HORVÁTHOVÁ, Ágnes, Natália ČURILLOVÁ, Barbora STRATILOVÁ, Vladimír FARKAŠ a Eva STRATILOVÁ. *Testovanie inhibičného účinku komerčných antifungálnych látok na transglykozylázy Crh1, Crh2, Phr1 a Phr2*. Bratislava: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, 2019. ISBN 978-80-972752-6-6.

[166] Hexetidine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3607#section=Structures>

[167] Berberine chloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12456>

[168] 8-Hydroxyquinoline. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1923>

[169] Dichlorophen. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3037>

[170] Tioconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5482>

- [171] Amorolfine hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54259>
- [172] Sulbentine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/67686>
- [173] Miconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4189>
- [174] Gentian violet. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11057>
- [175] Zinc pyrithione. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26041>
- [176] Clotrimazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2812>
- [177] Thimerosal. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2007 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16684434>
- [178] Miconazole nitrate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68553>
- [179] Dequalinium chloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10649>
- [180] Flucytosine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3366>
- [181] Itraconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3793>
- [182] Fungizone. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965>
- [183] Tolnaftate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5510>

- [184] Ciclopirox olamine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/38911>
- [185] Enilconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37175>
- [186] Oxiconazole nitrate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9556529>
- [187] Triclosan. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564>
- [188] 2,3-Dichloroanisole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16126>
- [189] Bifonazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2378>
- [190] Butenafine hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443867>
- [191] Sclareolide. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/929262>
- [192] Gibberellic acid. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6466>
- [193] Piroctone olamine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/50258>
- [194] Natamycin. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284447>
- [195] Xolegel. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456201>
- [196] Pravastatin sodium. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2007 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16759173>

- [197] Phenylmercuric acetate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2007 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16682730>
- [198] Salicylanilide. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6872>
- [199] Zinc undecylenate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11179>
- [200] Clioquinol. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2788>
- [201] Chloroxylenol. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2723#section=3D-Conformer>
- [202] Chlorobutanol. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5977>
- [203] Salicylic acid. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338>
- [204] Magnolol. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72300>
- [205] Chlorquinaldol. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6301>
- [206] Spectinomycin dihydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64740>
- [207] Thiabendazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5430>
- [208] Tromethamine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6503>
- [209] Fluconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3365>

- [210] Climbazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37907>
- [211] Terbinafine hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282481>
- [212] Mechllorethamine hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5935>
- [213] Butoconazole nitrate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/47471>
- [214] Ciclopirox. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2749>
- [215] Nifuratel. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6433427>
- [216] Naftifine hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281098>
- [217] Nilstat. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6433272>
- [218] Luliconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3003141>
- [219] Pentamidine isethionate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8813>
- [220] Isavuconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6918485>
- [221] Efinaconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/489181>
- [222] Carbendazim. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429>

- [223] Myclobutanil. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6336>
- [224] Econazole nitrate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68589>
- [225] Pefloxacin mesylate dihydrate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6917670>
- [226] Kasugamycin hydrochloride. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/88045>
- [227] Voriconazole. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71616>
- [228] Hygrovetine. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2012 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/56928061>
- [229] Micafungin sodium. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2008 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23666118>
- [230] Liranaftate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3936>
- [231] Caspofungin acetate. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2006 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6850808>
- [232] Antimycin A. In: *PubChem* [online]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14957>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA– auxiliárne aktivity

ACN- acetonitril

APS- persíran amónny

CE- karbohydrátesterázy

CM-chitín – karboxymetyl chitín

DHB- kyselina dihydroxybenzoová

DP – stupeň polymerizácie

DTT- ditiotreitol

FUDP- 5-fluoruridíndifosfát

FdUMP- 5-fluorodeoxyuridínmonofosfát

FUTP- 5-fluoruridíntrifosfát

GH- glykozidové hydrolázy

GPI – glykozyl fosfatidyl inozitol

GT- glykozyltransferázy

HIV- vírus ľudskej imunodeficiencie

HPLC- vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

CH5-SR – sulforodamínom značený pentachitoligosacharid

CHCA- kyselina 4-hydroxy- α -kyanoškoricová

IA- jódacetamid

Lam- laminarín

LaO4-LaO6- laminarioligosacharidy so stupňom polymerizácie 4-6

LaO5-SR- sulforodamínom značený pentalaminarioligosacharid

MALDI-TOF- laserová desorpčná ionizácia na nosiči

MGY- glycerolové médium

MMY- metanolové médium

PL- polysacharidové lyázy

PMD- mezlát dihydrátu pefloxacínu

SR- sulforodamín

TEMED- tetrametyletándiamín

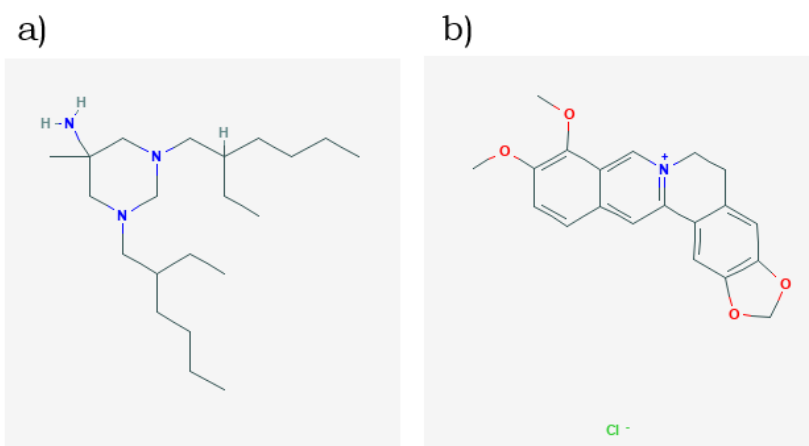
TFA- kyselina trifluóroctová

TLC- tenkovrstvová chromatografia

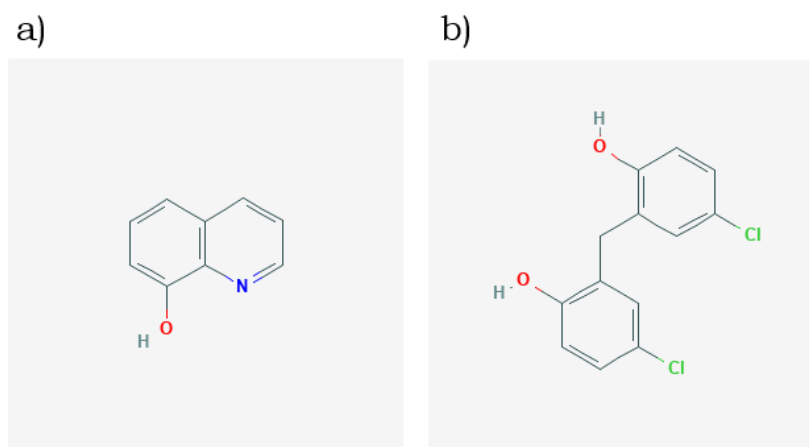
XET- xyloglukánendotransglykozyláza

9 PRÍLOHY

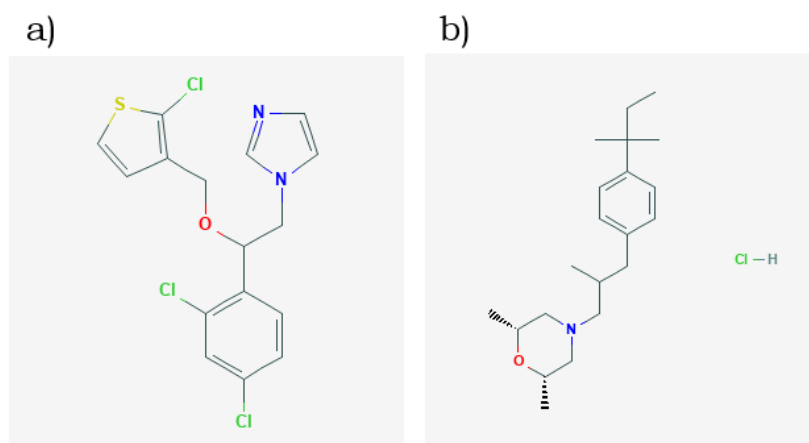
Príloha 1: Štruktúry antifungálnych látok z knižnice komerčných inhibítorov TargetMol



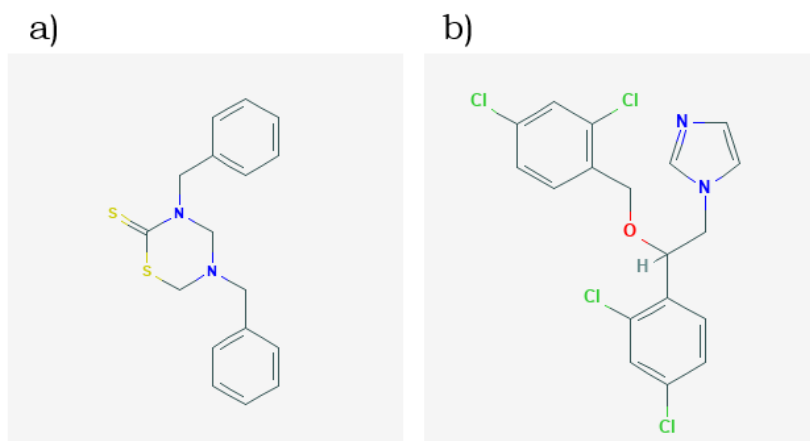
Obrázok 1: a) hexatidín b) berberín hydrochlorid [166] [167]



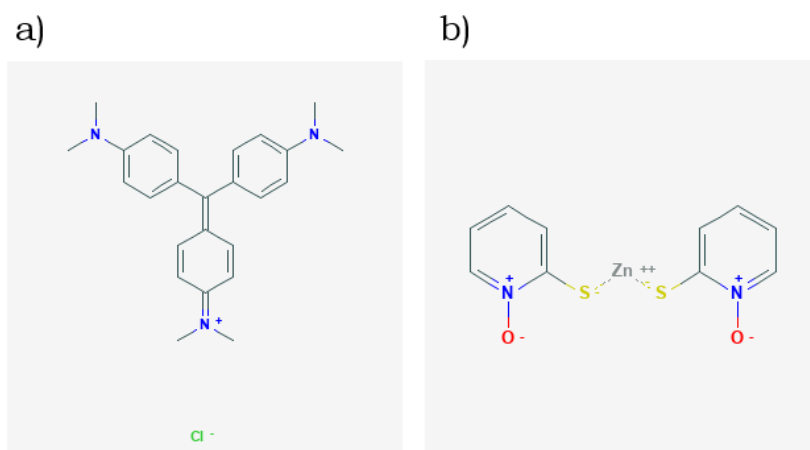
Obrázok 2: a) hydroxichinolín b) dichlorofén [168] [169]



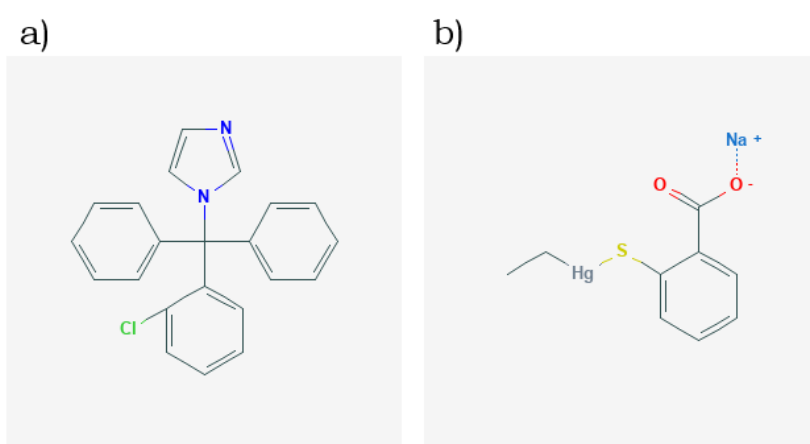
Obrázok 3: a) vagistat b) amorfín hydrochlorid [170] [171]



Obrázok 4: a) sulbentín b) mikonazol [172] [173]

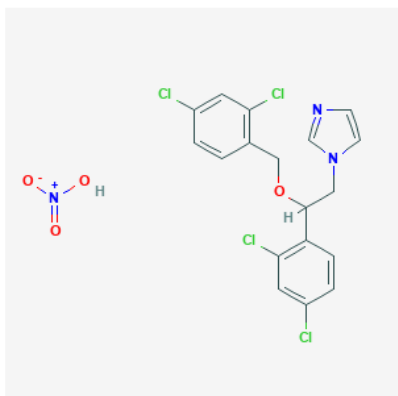


Obrázok 5: a) kryštalová violet' b) pyritión zinku [174] [175]

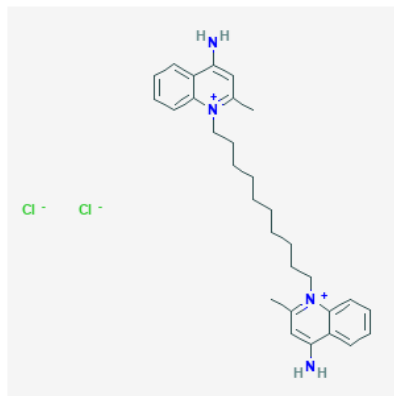


Obrázok 6: a) klotrimazol b) tiomersal [176] [177]

a)

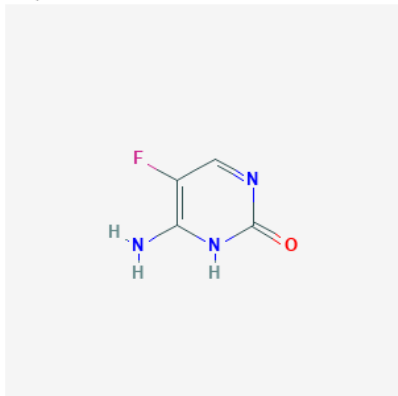


b)

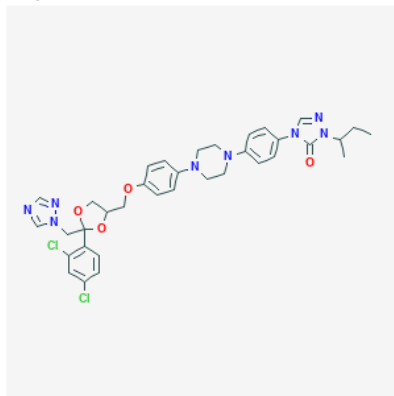


Obrázok 7: a) mikonazol nitrát b) dequalínium chlorid [178] [179]

a)

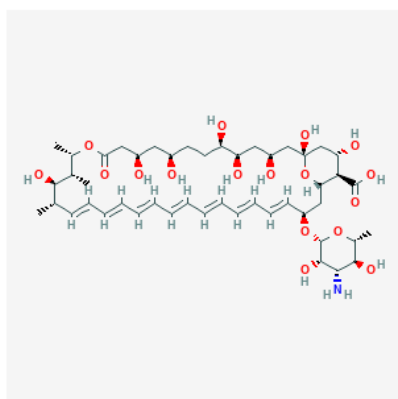


b)

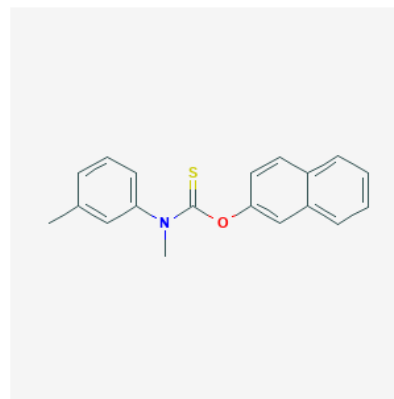


Obrázok 8: a) fluorocytosín b) itrakonazol [180] [181]

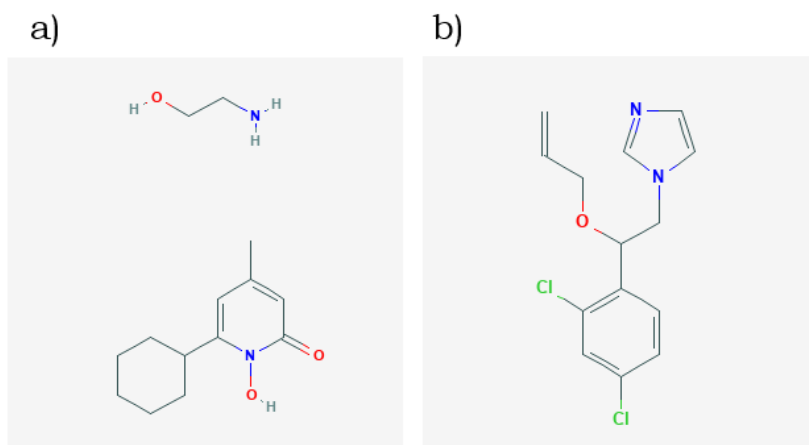
a)



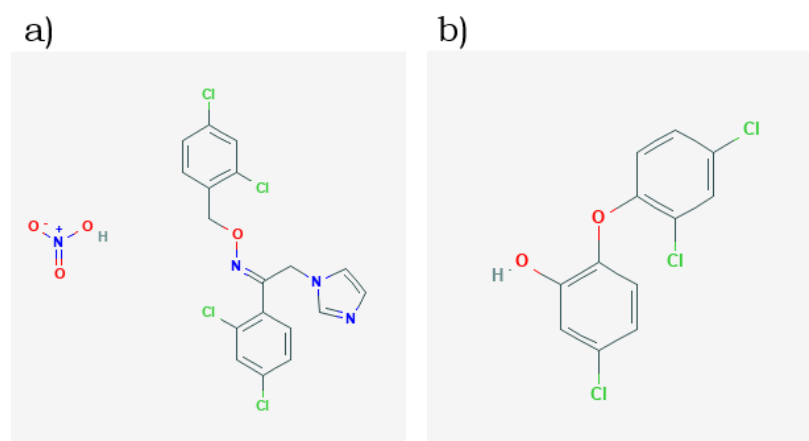
b)



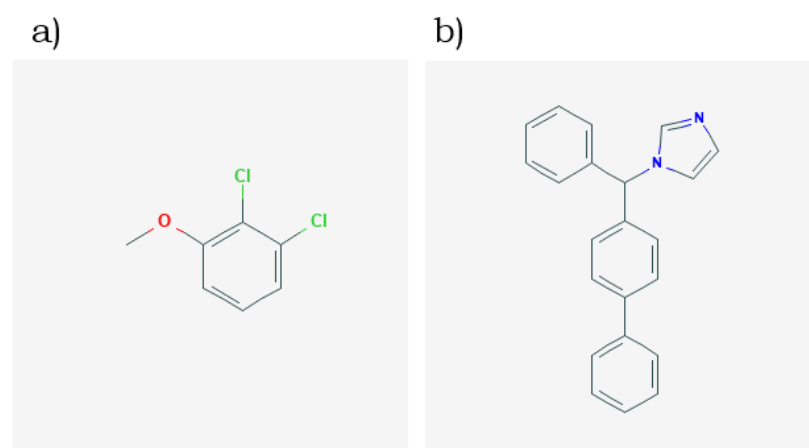
Obrázok 9: a) amfotericín B b) tolinaftát [182] [183]



Obrázok 10: a) ciklopirox etanolamín b) imazalil [184] [185]

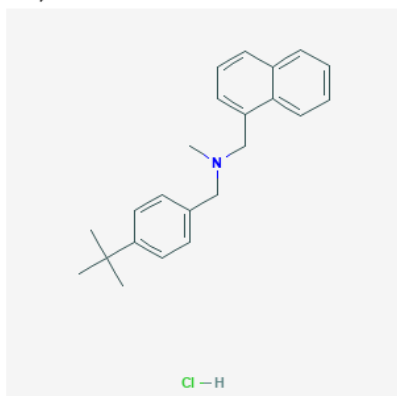


Obrázok 11: a) oxikonazol nitrát b) triklosan [186] [187]

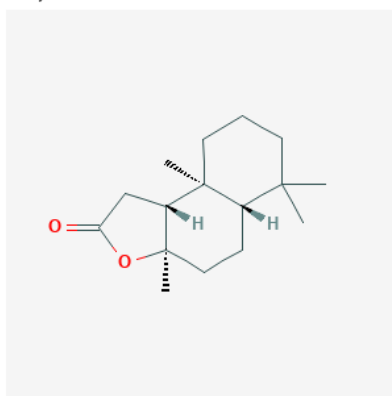


Obrázok 12: a) 2,3-dichlóranizol b) bifonazol [188] [189]

a)

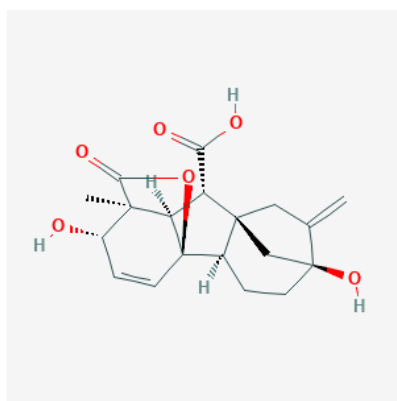


b)

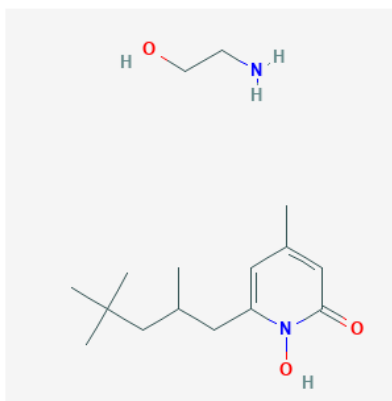


Obrázok 13: a) butenafin hydrochlorid b) sklareolid [190] [191]

a)

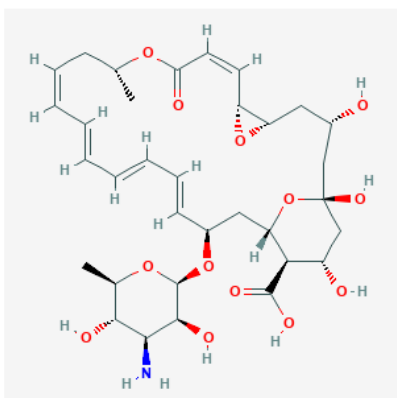


b)

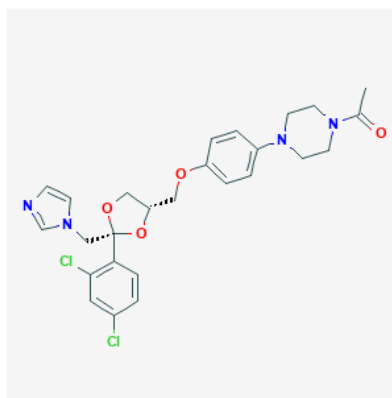


Obrázok 14: a) kyselina giberelová b) pirokton olamín [192] [193]

a)

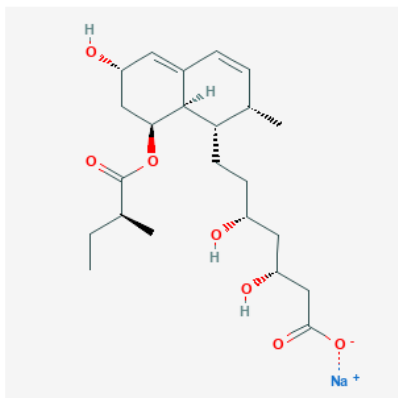


b)

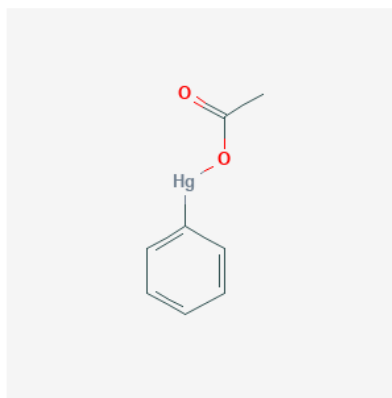


Obrázok 15: a) pimaricín b) ketokonazol [194] [195]

a)

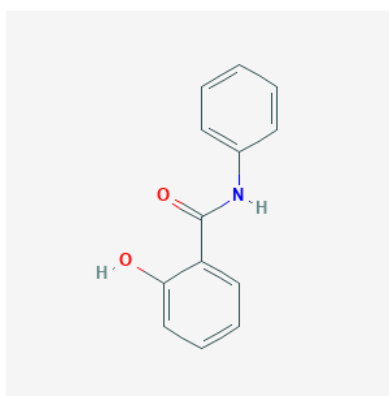


b)

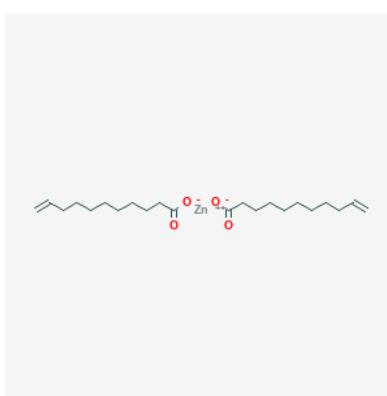


Obrázok 16: a) pravastatín sodný b) octan fenylortuťnatý [196] [197]

a)

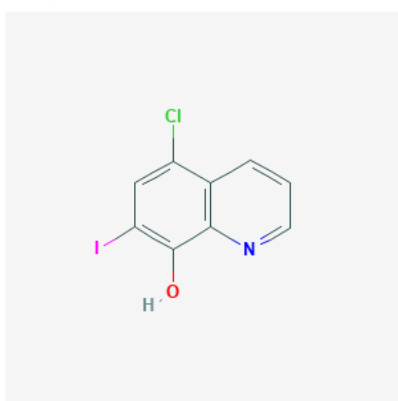


b)

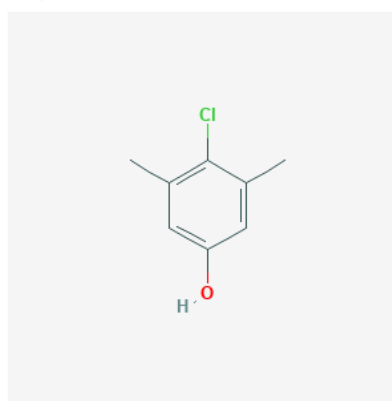


Obrázok 17: a) salicylanilid b) undecylenát zinočnatý [198] [199]

a)

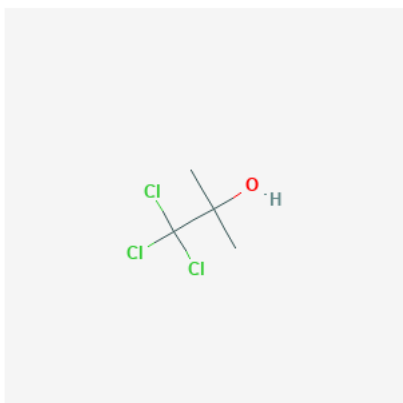


b)

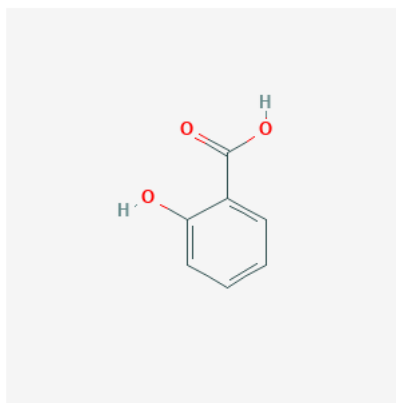


Obrázok 18: a) kliočinol b) chloroxylenol [200] [201]

a)

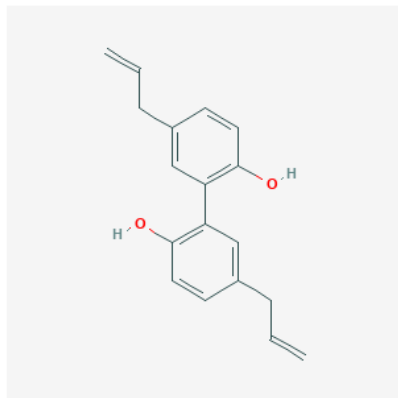


b)

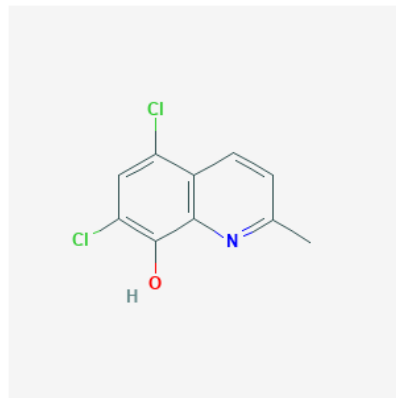


Obrázok 19: a) chlorobutanol b) kyselina salicylová [202] [203]

a)

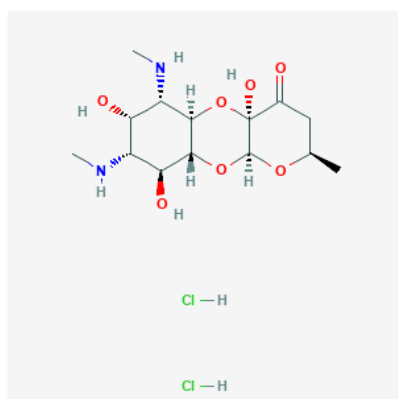


b)

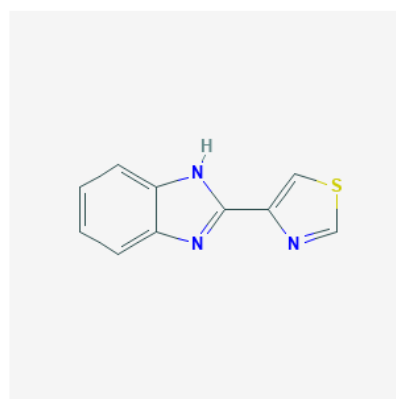


Obrázok 20: a) magnolol b) chlórchinaldín [204] [205]

a)

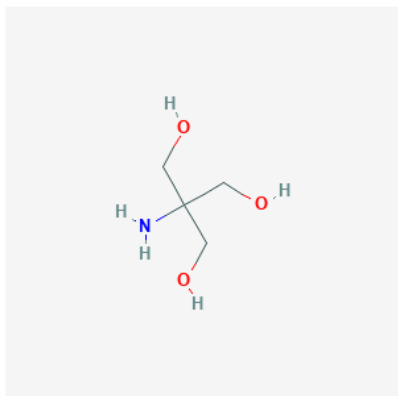


b)

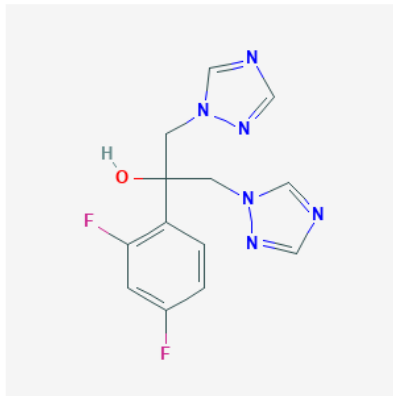


Obrázok 21: a) spektinomycín dihydrochlorid b) tiabendazol [206] [207]

a)

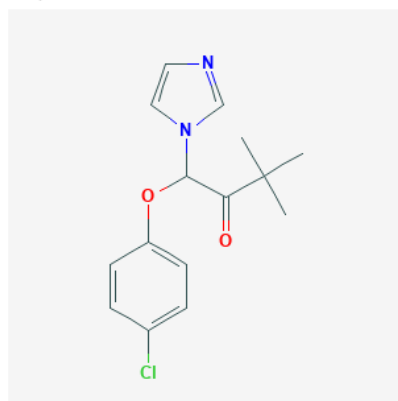


b)

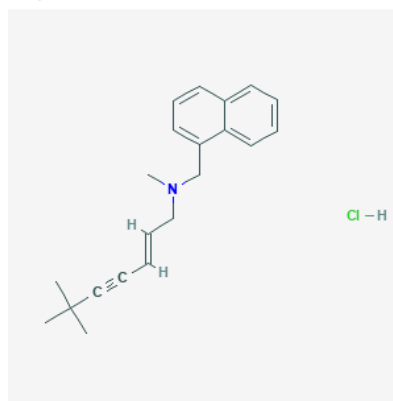


Obrázok 22: a) trometamol b) flukonazol [208] [209]

a)

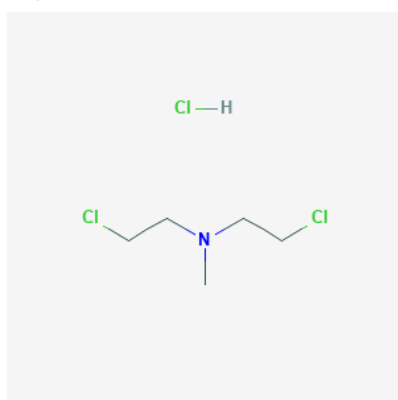


b)

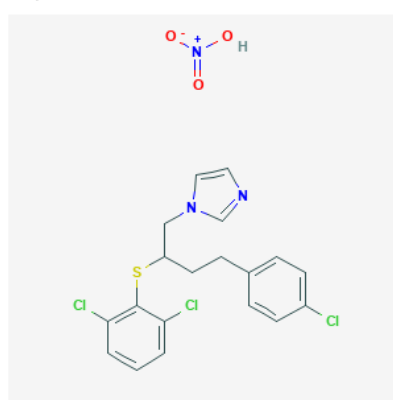


Obrázok 23: a) klimbazol b) terbinafin hydrochlorid [210] [211]

a)

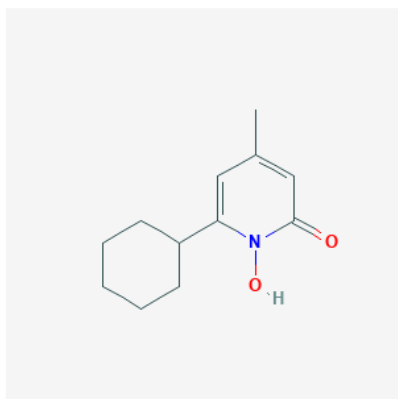


b)

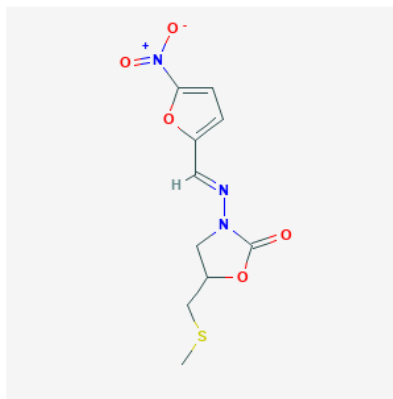


Obrázok 24: a) mechlóretamín hydrochlorid b) butokonazol nitrát [212] [213]

a)

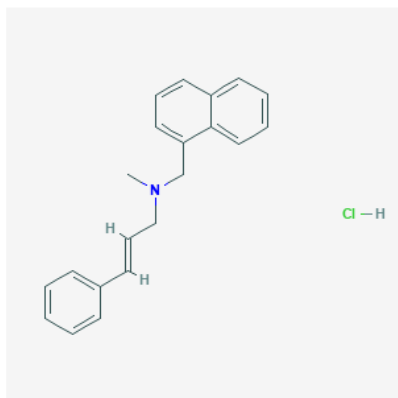


b)

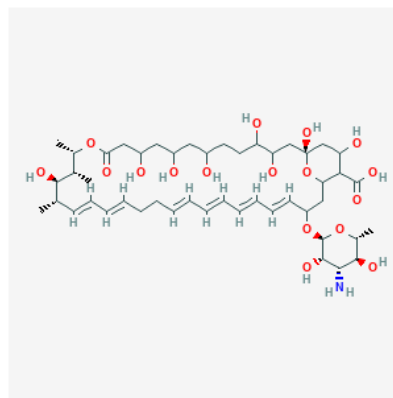


Obrázok 25: a) ciklopirox b) nifuratel [214] [215]

a)

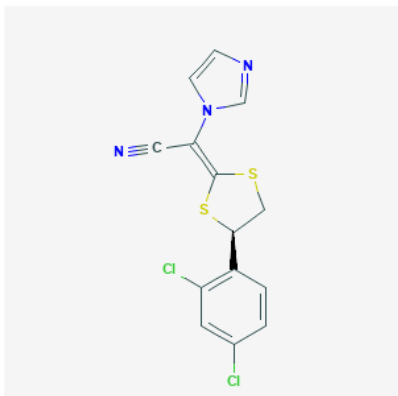


b)

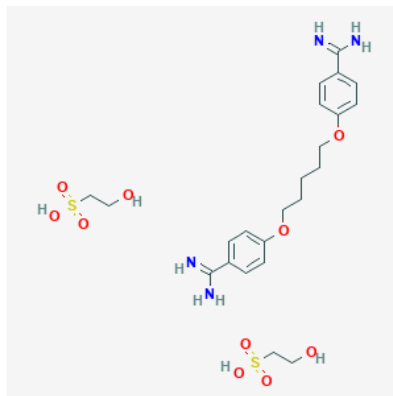


Obrázok 26: a) naftifin hydrochlorid b) nystatín [216] [217]

a)

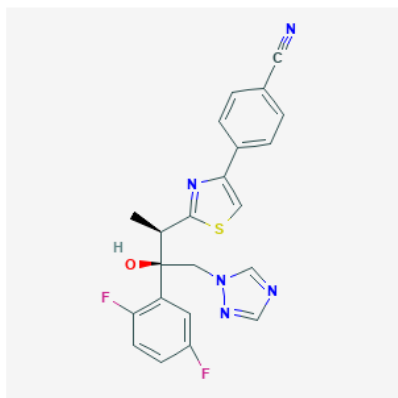


b)

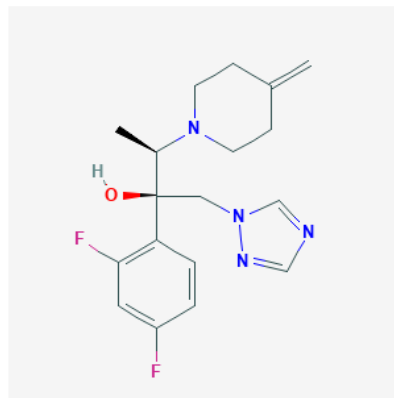


Obrázok 27: a) lulikonazol b) penatimidín izotionát [218] [219]

a)

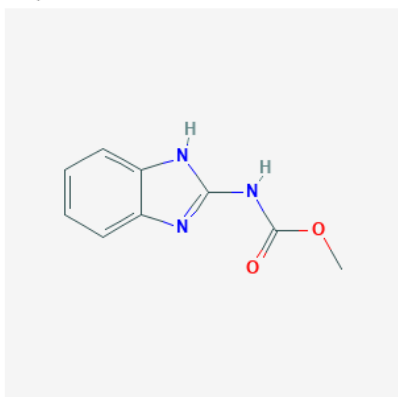


b)

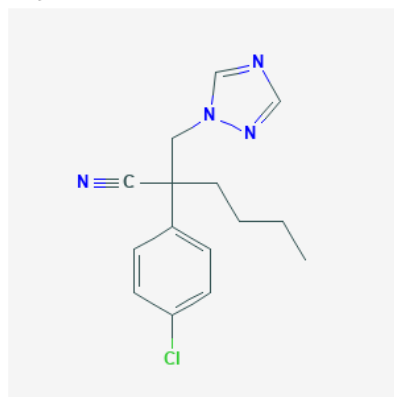


Obrázok 28: a) isavukonazol b) efinakonazol [220] [221]

a)

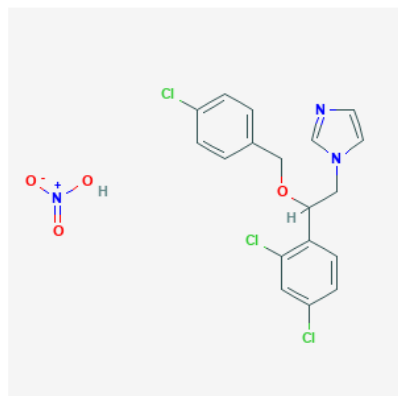


b)

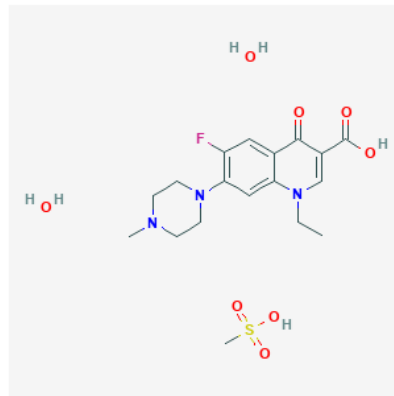


Obrázok 29: a) karbendazím b) myklobutanil [222] [223]

a)

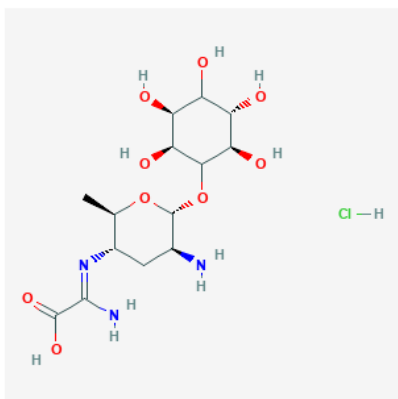


b)

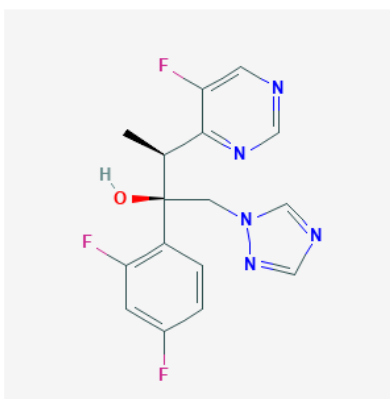


Obrázok 30: a) ekonazol nitrát b) PMD - mezlát dihydrátu pefloxacinu [224] [225]

a)

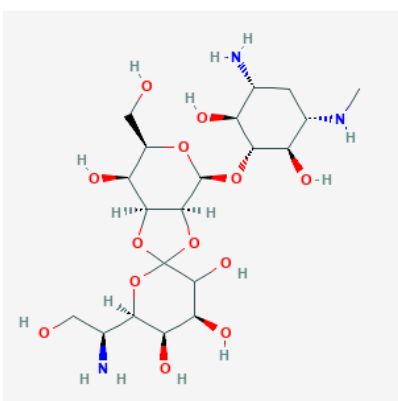


b)

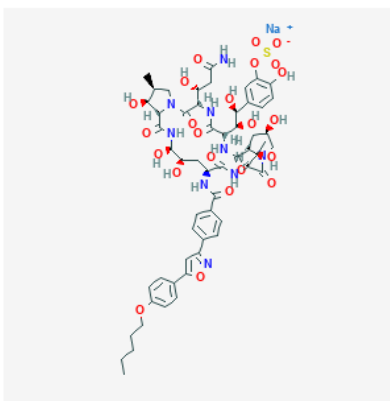


Obrázok 31: a) kasugamycín hydrochlorid b) vorikonazol [226] [227]

a)

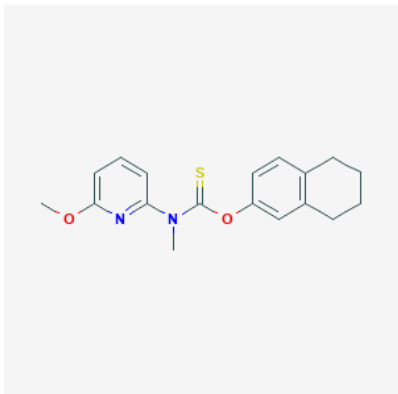


b)

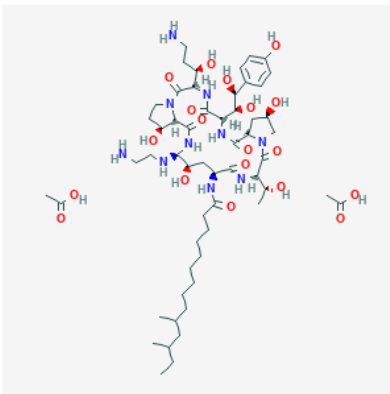


Obrázok 32: a) hygromycín B b) mikafungín sodný [228] [229]

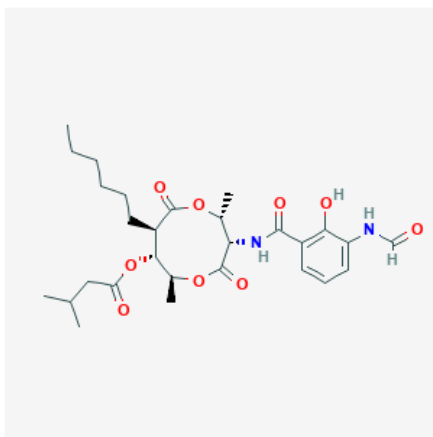
a)



b)



Obrázok 33: a) liranaftát b) kasprofungín [230] [231]



Obrázok 34: Antimycín A [232]